

# **Korrelationen der chemischen Verschiebung an schnell rotierenden biologischen Festkörpern mittels NMR-Spektroskopie**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Phys. Christian Herbst  
geboren am 03.10.1980 in Gera

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Witthuhn, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Reif, Berlin
3. Gutachter: Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Frankfurt

Tag der Disputation: 27.04.2010

# Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei folgenden Leuten, die alle auf Ihre Weise einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

- my supervisor Dr. Ramadurai Ramachandran, whose perpetual energy and enthusiasm in research only made this work possible;
- Prof. Dr. Wolfgang Witthuhn für die Übernahme des Hauptgutachtens und das Lesen meiner Arbeit;
- meinen Gutachtern für die Übernahme des Gutachtens;
- der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung Biomolekulare NMR-Spektroskopie herzlichst für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, mit einem ganz besonderen Dank an Dr. Kerstin Riedel, die mir stets bei Experimenten zur Seite stand und diese Arbeit mit vielen interessanten Ideen und zahlreichen Diskussionen unterstützt hat;
- Dr. Jörg Leppert im Speziellen für die Hilfe bei jeglichen technischen Problemen und das Korrekturlesen dieser Arbeit;
- Dr. Matthias Görlach für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Erinnerung an einfachste Grundregeln der Grammatik nach dem kritischen Durchsehen dieser Arbeit und die Unterstützung bei biochemischen Fragen;
- Dr. Frank Peuker und André Mischo für die kritischen Anmerkungen zur Verständlichkeit der Arbeit;
- Sabine Häfner für das Herstellen der (CUG)<sub>97</sub>-RNA-Probe;
- my wife Jirada for her steadfast emotional and even technical support which has been invaluable in helping me to focus on my academic pursuits;
- nicht zuletzt ganz besonders herzlich meinen Eltern für die stetige Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit, und allen Freunden, die mich verständnisvoll in der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und abgelenkt haben.

# Veröffentlichungen

Teile der hier vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht.

Herbst, C.; Riedel, K.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.:  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  chemical shift correlation in rotating solids without  $^1\text{H}$  decoupling during mixing. In: *ChemPhysChem* 8 (2007), S. 1770

Herbst, C.; Riedel, K.; Ihle, Y.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.: MAS solid state NMR of RNAs with multiple receivers. In: *J. Biomol. NMR* 41 (2008), S. 121

Herbst, C.; Herbst, J.; Kirschstein, A.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.: Design of high-power, broadband  $180^\circ$  pulses and mixing sequences for fast MAS solid state chemical shift correlation NMR spectroscopy. In: *J. Biomol. NMR* 43 (2009), S. 51

Herbst, C.; Herbst, J.; Kirschstein, A.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.: Recoupling and decoupling of nuclear spin interactions at high MAS frequencies: Numerical design of  $\text{CN}_n^V$  symmetry-based RF pulse schemes. In: *J. Biomol. NMR* 44 (2009), S. 175

Herbst, C.; Herbst, J.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.: Numerical design of  $\text{RN}_n^V$  symmetry-based RF pulse schemes for recoupling and decoupling of nuclear spin interactions at high MAS frequencies. In: *J. Biomol. NMR* 44 (2009), S. 235

Herbst, C.; Herbst, J.; Carella, M.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, M.; Ramachandran, R.: Broadband  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar recoupling via symmetry-based RF pulse schemes at high MAS frequencies. In: *J. Biomol. NMR* (2009) eingereicht

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>4</b>
1.1	Einleitung . . . . .	4
1.2	Ziele der Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>7</b>
2.1	Semiklassische Betrachtung . . . . .	7
2.1.1	Einführung . . . . .	7
2.1.2	Hochfrequenz-Feld . . . . .	8
2.1.3	Relaxation . . . . .	8
2.2	Quantenmechanische Betrachtung . . . . .	9
2.3	Wechselwirkungen . . . . .	10
2.3.1	Externes statisches Magnetfeld . . . . .	10
2.3.2	Externes transversales HF-Feld . . . . .	10
2.3.3	Chemische Verschiebung . . . . .	10
2.3.4	Heteronukleare dipolare Wechselwirkung . . . . .	12
2.3.5	Homonukleare dipolare Wechselwirkung . . . . .	12
2.3.6	Skalare Wechselwirkung . . . . .	12
2.4	Magic Angle Spinning . . . . .	13
2.5	Unterschiede zwischen Festkörper- und Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie .	14
2.6	Symmetrie-Theorie . . . . .	15
2.7	NMR-Spektrometer . . . . .	18
2.7.1	Supraleitender Magnet . . . . .	18
2.7.2	Probenkopf . . . . .	19
2.7.3	Sender . . . . .	19
2.7.4	Empfänger . . . . .	19
2.7.5	AD-Wandler . . . . .	20
2.7.6	Computer . . . . .	20
2.7.7	Verwendete Spektrometer . . . . .	20
2.8	Verwendete Proben . . . . .	21

<b>3</b>	<b>Korrelationsexperimente ohne <math>^1\text{H}</math>-Entkopplung</b>	
	<b>während der Mischzeit mit adiabatischen Pulsen</b>	<b>23</b>
3.1	Einleitung . . . . .	23
3.1.1	Adiabatische Inversionspulse . . . . .	24
3.1.2	RFDR . . . . .	25
3.1.3	TOBSY . . . . .	25
3.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	26
3.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Konstruktion von <math>180^\circ</math>-Pulsen und Mischsequenzen für Korrelationen der</b>	
	<b>chemischen Verschiebung</b>	<b>34</b>
4.1	Einleitung . . . . .	34
4.1.1	Genetische Algorithmen . . . . .	35
4.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	36
4.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	37
<b>5</b>	<b>Numerische Konstruktion symmetriebasierter <math>CN_n^V</math>-Pulssequenzen</b>	<b>47</b>
5.1	Einleitung . . . . .	47
5.1.1	Doppelquanten-Rückkopplung . . . . .	48
5.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	49
5.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	51
<b>6</b>	<b>Numerische Konstruktion symmetriebasierter <math>RN_n^V</math>-Pulssequenzen</b>	<b>62</b>
6.1	Einleitung . . . . .	62
6.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	62
6.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Dipolare <math>^{15}\text{N}</math>-<math>^{13}\text{C}</math>-Rückkopplung mittels symmetriebasierter HF-Pulssequen-</b>	
	<b>zen bei hohen MAS-Frequenzen</b>	<b>71</b>
7.1	Einleitung . . . . .	71
7.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	72
7.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	74
<b>8</b>	<b>MAS-Festkörper-NMR für RNA mit mehreren Empfängern</b>	<b>82</b>
8.1	Einleitung . . . . .	82
8.2	Numerische und experimentelle Methoden . . . . .	83
8.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	85
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
	<b>Anhang</b>	

# Abkürzungsverzeichnis

AHT .....	Average <b>H</b> amiltonian <b>T</b> heory
CP .....	cross <b>p</b> olarization
CSA .....	chemical <b>s</b> hift <b>a</b> nisotropy
CW .....	continuous <b>w</b> ave
DM1 .....	<b>m</b> yotonic <b>d</b> ystrophy <b>T</b> ype <b>1</b>
DQ .....	<b>d</b> ouble <b>q</b> uantum
FID .....	free induction <b>d</b> ecay
fpRFDR .....	finite <b>p</b> uls <b>RF</b> - <b>d</b> riven <b>r</b> ecoupling
FT .....	<b>F</b> ourier- <b>T</b> ransformation
GB1 .....	$\beta$ 1-Immunoglobulin- <b>b</b> indende Domäne des Proteins <b>G</b>
HF .....	<b>H</b> ochfrequenz
MAS .....	<b>m</b> agic <b>a</b> ngle <b>s</b> pinning
MBNL .....	<b>m</b> uscle <b>b</b> lind-like
NMR .....	<b>n</b> uclear <b>m</b> agnetic <b>r</b> esonance
POST .....	<b>p</b> ermutationally <b>o</b> ffset <b>s</b> tabilized
REDOR .....	rotational <b>e</b> cho <b>d</b> ouble <b>r</b> esonance
RFDR .....	<b>RF</b> - <b>d</b> riven <b>r</b> ecoupling
RNA .....	<b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid
SA .....	<b>G</b> enetic <b>A</b> lgorithm
SA .....	<b>S</b> imulated <b>A</b> nnealing
SIMPSON .....	<b>s</b> imulation <b>p</b> rogram for <b>s</b> olid-state-NMR spectroscopy
TMS .....	<b>T</b> etra <b>m</b> ethylsilan
TOBSY .....	<b>t</b> otal <b>t</b> hrough- <b>b</b> ond correlation spectroscopy
TPPM .....	<b>T</b> wo- <b>P</b> ulse <b>P</b> hase- <b>M</b> odulation
ZQ .....	<b>z</b> ero <b>q</b> uantum

# Kapitel 1

## Einführung

### 1.1 Einleitung

Die magnetische Kernresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) wurde 1945 von Bloch und Purcell unabhängig voneinander entdeckt [12; 81], beide erhielten 1952 dafür den Nobelpreis. Die NMR-Spektroskopie ist seitdem eine unentbehrliche Technik zur Untersuchung der Struktur, Dynamik und Funktion biologischer Moleküle. Sie wird aber auch in den Materialwissenschaften und der chemischen Analytik eingesetzt. Biologische Moleküle können dabei in Lösung sowie fester Phase untersucht werden. Der Kernmagnetismus bildet die Grundlage der NMR-Spektroskopie. Das magnetische Moment des Atomkerns ist verbunden mit einem Kerndrehmoment bzw. Kernspin. In einem statischen Magnetfeld spalten die Energieniveaus der Atomkerne aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem Magnetfeld und dem magnetischen Moment des Kernes auf. Für NMR-Untersuchungen sind vor allem Kerne mit einer Kernspinquantenzahl von  $1/2$  interessant, da hier die Aufspaltung in genau zwei Energieniveaus erfolgt. Zur Strukturuntersuchung von biologischen Molekülen werden deshalb vor allem die Spin- $1/2$ -Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ , aber auch  $^{31}\text{P}$ , beobachtet. Die Verteilung der Kerne auf die verschiedenen Energieniveaus wird im thermischen Gleichgewicht durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt. Im NMR-Experiment werden Übergänge zwischen diesen Niveaus durch Einstrahlung von hochfrequenten (HF) Feldern senkrecht zum statischen Magnetfeld induziert und beobachtet. Die Frequenz der HF-Felder muss dabei der Energiedifferenz zwischen den Niveaus entsprechen. Die dadurch angeregten Kerne senden HF-Quanten beim Übergang in den Grundzustand aus. Durch Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls werden die Energielevel beeinflusst, wodurch Informationen über die Struktur gewonnen werden können. Anfänglich wurde mit der *continuous wave* (CW)-Methode gearbeitet, bei der die Frequenz des eingestrahlten HF-Feldes linear erhöht bzw. verrin-



gert wird. In Resonanz wird ein Signal beobachtet. Aufgrund der geringen Sensitivität und des hohen Zeitbedarfs dieser Methode verwendet man heutzutage hauptsächlich die gepulste NMR-Spektroskopie. Dabei werden alle Kerne einer Kernsorte gleichzeitig mit einem kurzen HF-Puls einer bestimmten Frequenz angeregt. Der freie Induktionsabfall (*free induction decay*, FID) wird danach als zeitabhängiges Signal gemessen und per Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt. Eine weitere Verbesserung konnte durch die Entwicklung der multidimensionalen NMR-Spektroskopie erreicht werden. Diese ermöglichte eine höhere Empfindlichkeit sowie die Gewinnung von Informationen, die in eindimensionalen Experimenten nicht zugänglich waren.

## 1.2 Ziele der Arbeit

Die NMR-Spektroskopie ist ein leistungsstarkes Werkzeug für Strukturstudien und wird routinemäßig für kleine bis mittelgroße biologische Systeme in Lösung verwendet. Infolge begrenzter Löslichkeit, breiter Spektrallinien aufgrund kurzer Relaxationszeiten großer Moleküle sowie Problemen bei der Herstellung von Einkristallen für die Röntgenkristallographie, ist es oft notwendig, auf Festkörper-NMR-Spektroskopie auszuweichen. Das Potenzial dieser Technik wurde in Strukturuntersuchungen an Peptiden und Proteinen [18; 58; 67; 68; 94; 114] sowie Ribonukleinsäuren [76; 90] und Amyloid-Fibrillen [79; 103] aufgezeigt. Grundlegend für NMR-Experimente im Allgemeinen ist die Resonanzzuordnung, bei der jedem Kern im Molekül ein Resonanzsignal im NMR-Spektrum zugeordnet wird. Dies erlaubt nachfolgende Untersuchungen von Abständen, Torsionswinkeln und anderen strukturellen Parametern. Mittels numerischer Verfahren wird daraus eine Struktur berechnet, die konsistent mit den so bestimmten Parametern ist. Es ist somit naheliegend, sich mit der Entwicklung und Verbesserung von Korrelationsexperimenten der chemischen Verschiebung zu beschäftigen, welche für Resonanzzuordnungen und Abstandsmessungen genutzt werden können. Besonderes Augenmerk sollte darauf gelegt werden, dass die Pulssequenzen auch bei hohen Drehfrequenzen anwendbar sind, bei denen die negativen Effekte anisotroper Wechselwirkungen eliminiert werden.

In diesem Kontext wurden in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe die Vorteile aufgezeigt, Korrelationsexperimente ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit durchzuführen. Damit konnten Interferenzen zwischen dem Entkopplungs- und Rückkopplungskanal verhindert werden. Allerdings besitzt der dort verwendete tanh/tan-Puls einen hohen HF-Leistungsfaktor, wodurch solche Mischsequenzen potentiell Schä-

den an der Probe und/oder der NMR-Technik verursachen können. Deshalb wird in dieser Arbeit untersucht, ob adiabatische Pulse mit niedrigem HF-Leistungsfaktor effektiv in homonuklearen Korrelationsexperimenten eingesetzt werden können.

Da adiabatische Pulse nicht immer zufriedenstellende Wirksamkeit zeigen, wird hier das HF-Pulsprofil den experimentellen Gegebenheiten angepasst. Hierfür wird die globale Optimierungsmethode *Genetic Algorithms* (GA) angewandt, um effiziente  $180^\circ$ - und  $360^\circ$ -Pulse zu generieren. Diese sollen in einem weiteren Schritt in Pulssequenzen verwendet werden, deren Effektivität numerisch und experimentell überprüft wird. Weiterführend sollen solche Pulse genutzt werden, um symmetriebasierte Rückkopplung auch bei hohen Drehfrequenzen zu erreichen. Die Anwendbarkeit wird zuerst für homonukleare  $CN_n^V$ - und  $RN_n^V$ -Pulssequenzen geprüft und dann auf heteronukleare  $RN_n^{V_s, V_k}$ -Rückkopplungssequenzen erweitert, in denen die Einstrahlung von HF-Pulsen auf zwei Kanälen notwendig ist. Dabei werden zwei verschiedene Varianten, die Phasenmodulationsprofile darzustellen, verwendet: (i) als Teilsumme einer Fourierreihe oder (ii) eingeteilt in eine kleine Zahl von Intervallen gleicher Länge.

Moderne Spektrometer besitzen das Potenzial, mittels mehrerer Empfänger verschiedene Signale gleichzeitig aufzunehmen. Dies soll mittels hier zu entwickelnden  $RN_n^{V_s, V_k}$ -Pulssequenzen sowohl zur gleichzeitigen Aufnahme von 2D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - sowie von 3D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -( $^1\text{H}$ )- $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren erfolgen. Diese Experimente erlauben die Zuordnung von Resonanzen sowie eine Untersuchung der globalen Faltung von Proteinen. Weiterhin sollen mehrere Empfänger zur simultanen Durchführung von CHHC-, CHHN-, NHHC-, und NHHN-Experimenten verwendet werden, welche besonders wichtig in strukturellen Studien an Ribonukleinsäuren sind. So können unter anderem Wasserstoffbrückennetzwerke und der glykosidische Torsionswinkel  $\chi$  charakterisiert werden. Durch die Aufnahme aller vier Spektren in einem einzigen Experiment wird eine erhebliche Zeitersparnis erreicht.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Semiklassische Betrachtung

#### 2.1.1 Einführung

Eine charakteristische Größe des Atomkerns ist das magnetische Dipolmoment  $\vec{\mu}$ , welches über

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$$

mit dem Kerndrehmoment  $\vec{I}$  verbunden ist, wobei  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis ist. Im Magnetfeld präzediert  $\vec{\mu}$  um den magnetischen Feldvektor  $\vec{B}_0$

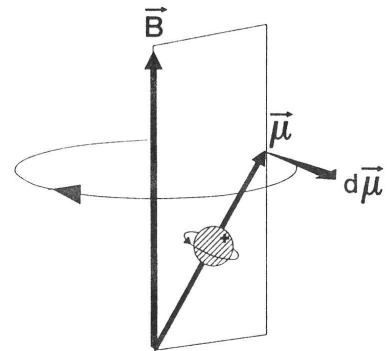


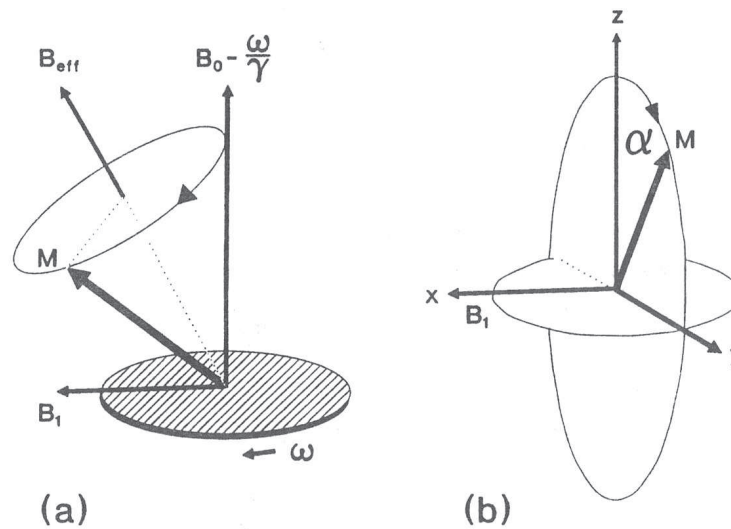
Abb. 2.1: Präzession des Dipolmomentes, aus [106]

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = -\gamma \vec{B}_0 \times \vec{\mu}$$

mit der *Lamorfrequenz*  $\omega_0 = \gamma B_0$  (Abb. 2.1). In einer NMR-Probe mit vielen Kernen gilt für die Gesamtmagnetisierung  $\vec{M}$

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma \vec{B}_0 \times \vec{M},$$

wobei sich durch die Präzession die magn. Dipolmomente in der zu  $\vec{M}$  senkrechten Ebene gegenseitig auslöschen. Es bleibt daher nur die parallel zu  $\vec{B}_0$  stehende Magnetisierung. Die Richtung von  $\vec{B}_0$  sei bis auf weiteres die z-Achse, dazu senkrecht die x-y-Ebene. Um ein NMR-Signal zu detektieren, muss der Magnetisierungsvektor  $\vec{M}$  von der z-Achse weggelenkt werden. Der entstehende oszillierende Dipol induziert einen Strom in der Empfängerspule, der als NMR-Signal detektiert wird.



**Abb. 2.2:** a) Präzession des Magnetisierungsvektors um  $B_{\text{eff}}$  im mitbewegten Bezugssystem. b) Resonanzfall,  $\omega = \omega_0$ . Abb. aus [106]

### 2.1.2 Hochfrequenz-Feld

Um  $\vec{M}$  aus der z-Achse auszulenken, wird ein zusätzliches Feld  $\vec{B}_1$  senkrecht zu  $\vec{B}_0$  für eine Dauer  $t_p$  eingestrahlt.  $\vec{M}$  präzediert nun um das resultierende Feld. Wäre  $\vec{B}_1$  ein statisches Feld, müsste es in der gleichen Größenordnung wie  $\vec{B}_0$  liegen, um eine Wirkung zu erzielen. Dies ist anders bei Verwendung eines oszillierenden  $\vec{B}_1$ -Feldes, hier dreht sich  $\vec{B}_1$  mit einer Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  um die z-Achse. Im mitbewegten System gilt dann für das effektive Magnetfeld

$$B_{\text{eff}} = \sqrt{B_1^2 + (B_0 - \omega/\gamma)^2},$$

um das sich  $\vec{M}$  mit der effektiven Präzessionsgeschwindigkeit

$$\omega_{\text{eff}} = \sqrt{\omega_1^2 + (\omega_0 - \omega)^2}$$

dreht (Abb. 2.2). Ist die Trägerfrequenz  $\omega$  in Resonanz, also der Resonanzoffset  $\Delta\omega = \omega - \omega_0 = 0$ , folgt  $B_{\text{eff}} = B_1$  und  $\vec{M}$  wird um einen Winkel  $\alpha = \gamma B_1 t_p$  ausgelenkt. Besonders wichtig für die NMR-Spektroskopie sind die Auslenkungswinkel  $90^\circ$  und  $180^\circ$ .

### 2.1.3 Relaxation

Nach Abschalten des  $\vec{B}_1$ -Feldes geht  $\vec{M}$  wieder in seine Ausgangsposition zurück. Die Ursache dafür ist der Austausch von Energie zwischen dem Spin-System und der Umgebung, sowie das Auffächern der transversalen Magnetisierung, da die magnetischen

Kernmomente geringfügig unterschiedliche Präzessionsfrequenzen haben. Dies macht man sich anhand

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma\vec{B} \times \vec{M}$$

und der Einführung zweier Relaxationszeiten  $T_1$  (longitudinale Relaxation) und  $T_2$  (transversale Relaxation) klar. Mit

$$B_x = B_1 \quad B_y = 0 \quad B_z = (B_0 - \omega/\gamma)$$

erhält man im rotierenden System:

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}M_x &= (\omega_0 - \omega)M_y - \frac{1}{T_2}M_x \\ \frac{d}{dt}M_y &= -(\omega_0 - \omega)M_x - \frac{1}{T_2}M_y + \omega_1M_z \\ \frac{d}{dt}M_z &= -\omega_1M_y - \frac{1}{T_1}(M_z - M_0)\end{aligned}$$

Diese Gleichungen sind die Bloch-Gleichungen.

## 2.2 Quantenmechanische Betrachtung

Das NMR-Signal resultiert aus der zeitlichen Entwicklung einer Vielzahl von Atomkernen bzw. Kernspins. Im Idealfall eines reinen Zustandes haben alle Spins den gleichen Zustand, welcher durch die Wellenfunktion  $|\Phi(t)\rangle$  beschrieben wird. Die Schrödinger-Gleichung

$$\frac{d}{dt}|\Phi(t)\rangle = -i\frac{\hbar}{2\pi}\hat{\mathcal{H}}(t)|\Phi(t)\rangle$$

bestimmt die zeitliche Entwicklung dieses Systems, wobei  $\hat{\mathcal{H}}(t)$  der zeitabhängige Hamiltonoperator ist. Der Dichteoperator  $\hat{\rho}(t)$  wird zur Beschreibung des Zustandes des Systems benutzt. Die Diagonalelemente  $\rho_{jj}$  geben die Wahrscheinlichkeit an, das System im Zustand  $|j\rangle$  vorzufinden, mit  $j = 1, 2, \dots, 2I + 1$ . Die Nichtdiagonalelemente repräsentieren die Superposition zweier Zustände. Die entsprechende Wellenfunktion  $|\Phi(t)\rangle = c_i|i\rangle + c_j|j\rangle$  zeigt einen Übergang zwischen beiden Zuständen an und wird als kohärente Superposition bzw. Kohärenz bezeichnet. Durch die Differenz der magnetischen Quantenzahlen  $m_j$  der Zustände werden diese Kohärenzen in Einquanten-Kohärenzen ( $\Delta m_{ij} = \pm 1$ ), Nullquanten-Kohärenzen ( $\Delta m_{ij} = 0$ ) und Multiquanten-Kohärenzen ( $|\Delta m_{ij}| > 1$ ) unterteilt. Multiquanten-Kohärenzen können nur indirekt beobachtet werden, da kein Dipolübergang stattfindet.

Die Liouville-von-Neumann-Gleichung beschreibt die zeitliche Entwicklung des Dichteoperators:

$$\frac{d}{dt}\hat{\rho}(t) = i\frac{2\pi}{h}[\hat{\mathcal{H}}(t), \hat{\rho}(t)]$$

Die Lösung der Gleichung wird durch

$$\hat{\rho}(t) = \hat{\mathcal{U}}(t, 0)\hat{\rho}(0)\hat{\mathcal{U}}^\dagger(t, 0)$$

ausgedrückt, mit  $\hat{\rho}(0)$  als Dichteoperator im thermischen Gleichgewichtszustand. Der Entwicklungsoperator  $\hat{\mathcal{U}}(t, 0)$  ist mit dem Hamiltonoperator wie folgt verbunden:

$$\hat{\mathcal{U}}(t, 0) = T \exp(-i \int_0^t \hat{\mathcal{H}}(t') dt'),$$

wobei  $T$  der Dysonsche Zeitordnungsoperator ist.

## 2.3 Wechselwirkungen

### 2.3.1 Externes statisches Magnetfeld

Die Zeeman-Wechselwirkung wird durch das externe statische Magnetfeld  $B_0$  hervorgerufen und durch

$$\hat{\mathcal{H}}_0 = -\gamma B_0 \hat{I}_z = -\omega_0 \hat{I}_z$$

beschrieben, wobei Hamiltonoperatoren von nun an Frequenzeinheiten angegeben werden ( $\hat{\mathcal{H}}/(h/2\pi)$  wird durch  $\hat{\mathcal{H}}$  ersetzt).

### 2.3.2 Externes transversales HF-Feld

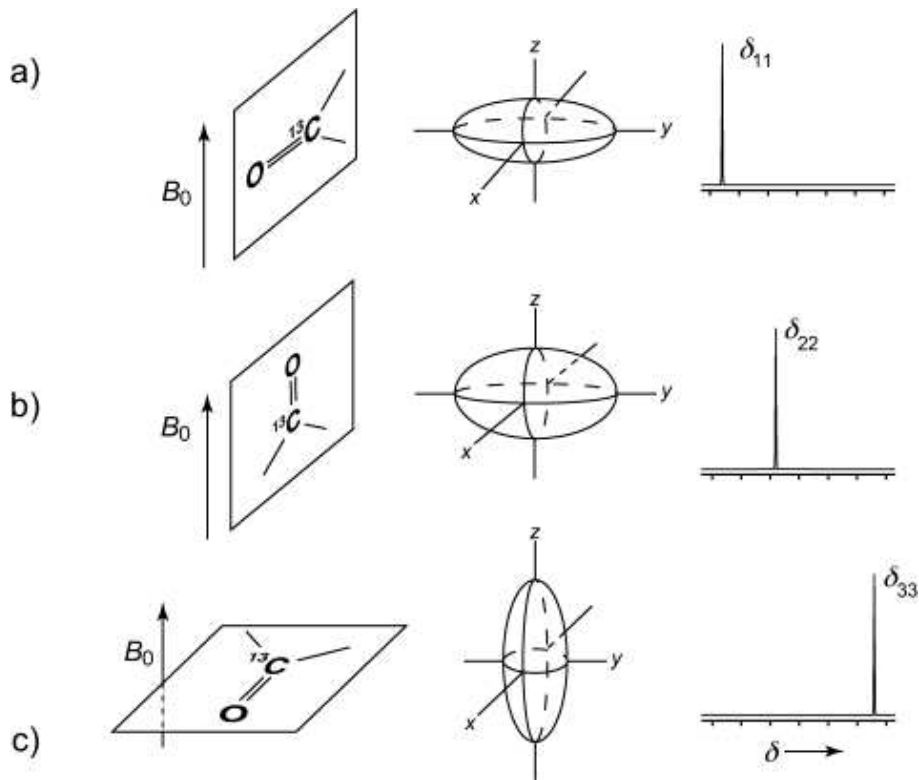
Der Effekt der Einstrahlung eines HF-Pulses senkrecht zum statischen Magnetfeld wird durch

$$\hat{\mathcal{H}}_{HF} = -\gamma B_1 (\hat{I}_x \cos(\omega t) - \hat{I}_y \sin(\omega t))$$

ausgedrückt.

### 2.3.3 Chemische Verschiebung

Selbst bei konstantem  $\vec{B}_0$ -Feld ist das Magnetfeld um die Kerne in der Probe nicht homogen. Die Ursache sind die um den Kern rotierenden Elektronen, welche ein Magnetfeld induzieren, das die Größe des effektiven Magnetfeldes am Ort des Kernspins ändert



**Abb. 2.3:** Schema der 3 CSA-Hauptwerte: a)  $\delta_{11}$ , b)  $\delta_{22}$ , c)  $\delta_{33}$ , wobei sich die Position des Signals je nach Orientierung des Magnetfelds zur Hauptachse des Tensors ändert. Abb. aus [61]

( $\vec{B} = (1 - \sigma)\vec{B}_0$ ,  $\sigma \dots$  Abschirmungstensor). Diese Veränderungen sind lokal verschieden (aufgrund von Änderungen der Elektronenverteilung durch verschiedene Bindungspartner, Bindungslängen, Bindungsorientierungen u.a.). Durch die verschiedenen Larmorfrequenzen können die Nachbarschaft der Atome und die räumliche Struktur untersucht werden. Die anisotrope chemische Verschiebung ist abhängig vom Abschirmungstensor, und wird in Bezug auf eine Referenzprobe (oft die  $^1\text{H}$ -Resonanz in Tetramethylsilan (TMS)) ausgedrückt:

$$\delta = (\sigma_{\text{ref}} - \sigma_0)(1 - \sigma_{\text{ref}})^{-1}10^6.$$

Die chemische Verschiebung wird in *ppm* (parts per million) angegeben.

Die Anisotropie der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy*, CSA) beruht darauf, dass die Elektronendichten nicht sphärisch, sondern zum Beispiel ellipsoidal entlang Bindungen oder nichtbindenden p-Orbitalen verteilt sind. Die Beeinflussung durch die CSA hängt von der Orientierung der Elektronenwolke zum  $\vec{B}_0$ -Feld ab (Abb. 2.3). In einer pulverisierten Probe liegen alle möglichen Orientierungen vor, man beobachtet ein Pulvermuster (siehe Kapitel 3). Den Hamiltonoperator der chemischen Verschiebung kann man in einen isotropen und einen anisotropen Term aufteilen. Für den Spezialfall

$\delta_{11} = \delta_{22}$  einer axialsymmetrischen Verteilung ergibt sich

$$\hat{\mathcal{H}}_{CS} = \gamma B_0 \hat{I}_z (\delta_{iso} + \frac{1}{2} \delta_{CSA} (3 \cos^2 \theta - 1))$$

mit  $\delta_{iso} = \frac{1}{3}(\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})$ ,  $\delta_{CSA} = \delta_{33} - \delta_{iso}$  und  $\theta$  als Winkel der Ellipsoid-Achse zu  $\vec{B}_0$ .

### 2.3.4 Heteronukleare dipolare Wechselwirkung

Die dipolare Wechselwirkung beruht auf der Interaktion der magnetischen Kernmomente zweier Spins. Bei zwei unterschiedlichen Kernen ergibt sich

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_{IS} &= d(3 \cos^2 \theta - 1) \hat{I}_z \hat{S}_z \\ &= \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r_{IS}^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \hat{I}_z \hat{S}_z \end{aligned}$$

$I$  und  $S$  sind die Kernspins der wechselwirkenden Kerne,  $d$  ist die dipolare Kopplungsstärke,  $\gamma$  die gyromagnetischen Verhältnisse der Spins,  $r_{IS}$  der Abstand zwischen den Kernen und  $\theta$  der Winkel zwischen dem internuklearen Vektor und  $\vec{B}_0$ . Die Stärke der Wechselwirkung hängt also vom Kernabstand ab (*through-space interaction*).

### 2.3.5 Homonukleare dipolare Wechselwirkung

Die dipolare WW kann auch zwischen Spins gleicher Atomkerne auftreten. Bei identischen Kernen kann es zu energieerhaltenden *Flipflop*-Prozessen kommen, bei denen ein Spin vom energiearmen Zustand in den energiereicheren übergeht, und gleichzeitig der Nachbarspin vom energiereichen in den energiearmen Zustand. Mit diesem Extraterm erhält man für den Hamiltonoperator

$$\hat{\mathcal{H}}_{II} = d \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) (3 \hat{I}_{1z} \hat{I}_{2z} - \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2)$$

### 2.3.6 Skalare Wechselwirkung

*J-coupling* resultiert aus der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung zwischen Elektronen und Kern. Diese ist  $10^2$  bis  $10^4$  mal kleiner als die direkte dipolare Wechselwirkung, tritt nur zwischen chemisch gebundenen Kernen auf (*through-bond interaction*) und ist isotrop. Mit der skalaren Kopplungskonstante  $J$  gilt für den Hamiltonoperator

$$\hat{\mathcal{H}}_J = J \hat{I} \hat{S}$$



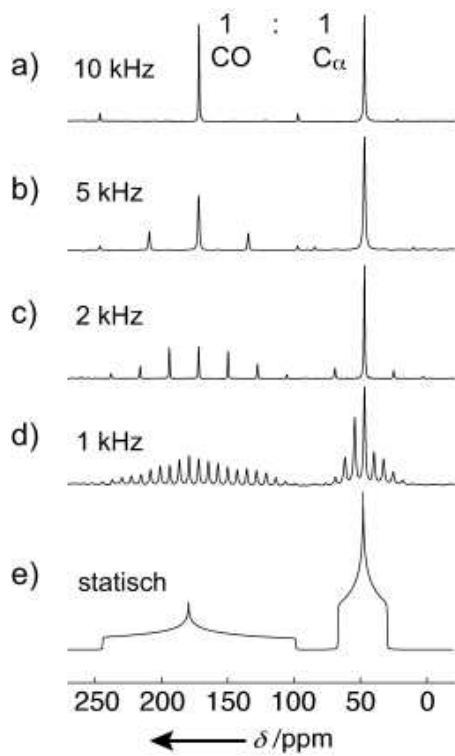


Abb. 2.4: Abhängigkeit eines Glyzin-Spektrums von der Drehgeschwindigkeit, aus [61]

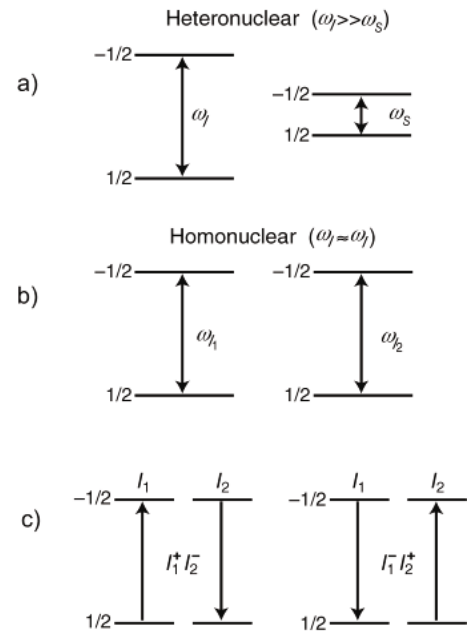


Abb. 2.5: a)  $\omega_I \neq \omega_S$ , keine Energieübertragung möglich, b)  $\omega_I = \omega_S$ , Energieübertragung durch Flipflop-Prozess (c) möglich. Abb. aus [61]

## 2.4 Magic Angle Spinning

Offensichtlich geben die anisotropen Wechselwirkungen keinen Beitrag zum Gesamt-Hamilton-Operator, falls der Term  $(3 \cos^2 \theta - 1)$  gegen Null geht. Dies ist der Fall beim magischen Winkel (*magic angle*)  $\theta_m = 54,74^\circ$ . Erreicht werden kann dies durch Verwendung eines Einkristalls, den man im magischen Winkel zum Magnetfeld ausrichtet. Da Einkristalle aber zumeist schwer herzustellen sind, lässt man die (Pulver-)Probe um eine Achse rotieren, welche um  $\theta_m$  zum Magnetfeld ausgelenkt ist, wodurch die anisotropen Effekte zeitlich herausgemittelt werden [2; 69]. Falls die Drehfrequenz nicht deutlich größer als die Anisotropie ist, erfolgt keine vollständige Auslöschung, im Spektrum treten sogenannte *spinning sidebands* auf, Rotationsbanden in Abständen von Vielfachen der Rotationsfrequenz (Abb. 2.4). Da man durch die anisotropen Wechselwirkungen Rückschlüsse auf die lokale Umgebung und die Geometrie der Kerne ziehen kann, ist man in bestimmten Situationen bestrebt, diese zu erhalten. Dies kann durch Einstrahlen spezieller Pulssequenzen erreicht werden, was als Rückkoppeln bezeichnet wird.

## 2.5 Unterschiede zwischen Festkörper- und Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie

Aufgrund der starken anisotropen Wechselwirkungen, wie dipolare Kopplungen und CSA, sind Linienbreiten in Festkörper-NMR-Spektren (Abb. 2.6) allgemein viel größer als in Flüssigkeits-NMR-Spektren. Durch die Molekularbewegungen werden die anisotropen Wechselwirkungen in Flüssigkeiten herausgemittelt. Festkörper-NMR-Spektren werden erst durch *Magic Angle Spinning* analysierbar.

Zumeist werden in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie Protonen beobachtet, da diese mit einem großen gyromagnetischen Verhältnis, geringer Relaxationszeit und hohem natürlichem Vorkommen für hochauflöste Spektren sorgen. Aufgrund des großen Netzwerks starker dipolarer Kopplungen zwischen den Wasserstoffkernen und der damit verbundenen Verbreiterung der Linien im Spektrum, beobachtet man in Festkörpern hauptsächlich  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne.

Verbessert wird die Signalintensität durch *Kreuzpolarisation* (CP) [80]. Hierbei wird das Signal von selten vorkommenden Kernen, wie die in Festkörper-NMR detektierten  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ , verstärkt, indem Polarisation von häufig vorkommenden Kernen, wie  $^1\text{H}$ , übertragen wird. Bei homonuklearen Kernen ist dieser Austausch automatisch durch energieerhaltende *Flipflop*-Prozesse möglich, bei heteronuklearen Kernen muss der Prozess durch Einstrahlen von HF-Feldern angeregt werden (Abb. 2.5). Eine von Hartmann und Hahn entwickelte Methode [35] wirkt durch Einstrahlen zweier HF-Felder, eines mit Resonanzfrequenz von Spin  $I$ , das andere mit derjenigen von Spin  $S$ . Sind die Nutationsfrequenzen beider Kerne gleich (erreichbar durch Variation der Amplitude der HF-Felder), so ist ein energieneutraler dipolarer Kontakt zwischen den Kernen hergestellt, Flipflop-Prozesse sind nun möglich. Man erhält die Hartmann-Hahn-Bedingung  $\gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S}$  (Abb. 2.7).

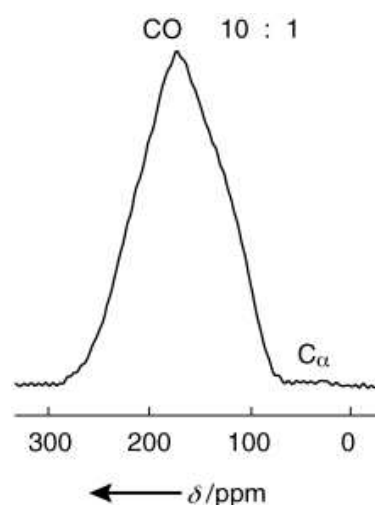
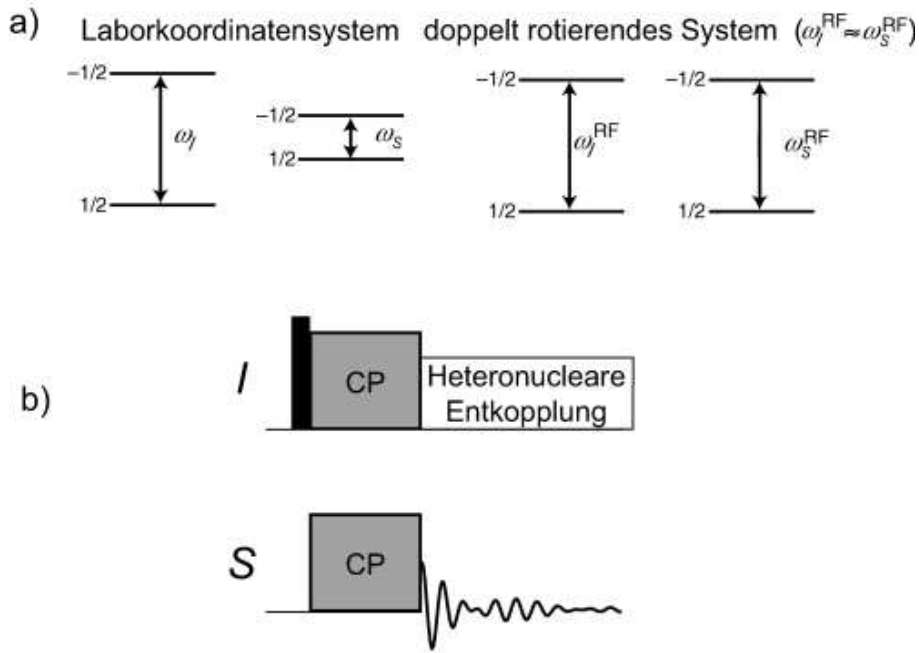


Abb. 2.6:  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektrum von 90 mg  $^{13}\text{C}$ -markiertem Glyzinpulver, aus [61]



**Abb. 2.7:** a) In einem doppelt rotierten Referenzkoordinatensystem nehmen die Energieunterschiede der Übergänge gleiche Werte an, wenn die Nutationsfrequenzen beider Spins gleich sind; b) Schema einer CP-Pulssequenz, aus [61]

## 2.6 Symmetrie-Theorie

Eine elegante Methode zur Beschreibung von Pulssequenzen wurde von Levitt et al. eingeführt [15; 16; 66]. Man ordnet diese in die Symmetrieklassen  $CN_n^\nu$  bzw.  $RN_n^\nu$  ein. Dabei werden die Rotationseigenschaften der nuklearen Wechselwirkungen genutzt, um einzelne Terme des Gesamt-Hamiltonoperators durch Wahl der Parameter  $n, N$  und  $\nu$  auszulöschen bzw. zu erhalten. Der Vereinfachung halber werden die Operatordächer in allen folgenden Gleichungen weggelassen. Aufgebaut sind diese Pulssequenzen aus  $N$  Elementen mit einer Gesamtlänge von  $T = N\tau_E = n\tau_r$  ( $\tau_E \dots$  Länge eines Elements,  $\tau_r \dots$  Länge einer Rotationsperiode) (Abb. 2.8). Die einzelnen Elemente werden je nach Symmetrieklasse nach einer bestimmten Vorschrift aus dem Basiselement  $C$  bzw.  $R$  gewonnen.

- $CN_n^\nu$ : Das Basiselement  $C$  hat den Propagator  $U^0 = R_x(Z_g\pi)$ , wobei  $Z_g$  einer geraden ganzen Zahl, sowie  $R_\chi(\phi) = \exp(-i\phi S_\chi)$  einer Rotation des Spins  $S$  um den Winkel  $\phi$  um die Achse  $\chi = \{x, y, z\}$  entspricht. Somit ergibt das Basiselement einen Puls, welcher den Spin  $S$  um ein ungerades Vielfaches von  $180^\circ$  um die  $x$ -Achse rotiert. Solche Pulse werden auch Universalrotationspulse genannt, da sie sowohl  $z$ - als auch  $y$ -Magnetisierung invertieren. Daraus folgt, dass das Basisele-

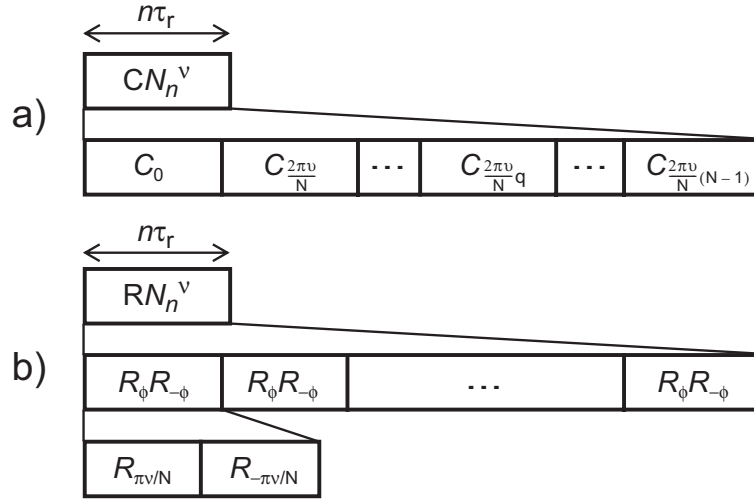


Abb. 2.8: Schema der Symmetrieklassen a)  $CN_n^v$  sowie b)  $RN_n^v$

ment den Spin wieder in den Anfangszustand zurückversetzen muss. Jedes weitere Element ist gegenüber dem Vorhergehenden um  $2\pi\nu/N$  phasenverschoben.

- $RN_n^v$ : Das Basiselement  $R$  hat den Propagator  $U^0 = R_x(Z_u\pi)$ , wobei  $Z_u$  einer ungeraden ganzen Zahl entspricht. Das Basiselement wird um  $\pi\nu/N$  phasenverschoben. Ein zweites Basiselement  $R'$  wird durch Ändern des Vorzeichens der Phase von  $R$  generiert.  $N/2$  Paare  $RR'$  ergeben eine Sequenz, wobei der Entwicklungsoperator des Paares  $\exp(-i4\phi I_z)$  entspricht.

Unter Rotation bei  $\nu_r$  kann der Hamiltonoperator wie folgt in äußere und innere Wechselwirkungen aufgeteilt werden:

$$\begin{aligned}\mathcal{H}(t) &= \mathcal{H}_{HF}(t) + \mathcal{H}_{int}(t) \\ \mathcal{H}_{int}(t) &= \sum_{\Lambda lm \lambda \mu} \omega_{lm}^\Lambda \exp(i2\pi m \nu_r t) T_{\lambda \mu}^\Lambda \quad (\text{Modulation durch Rotation}) \\ \text{bzw.} \quad \mathcal{H}_{int}(t) &= \sum_{\Lambda lm \lambda \mu} \omega_{lm}^\Lambda T_{\lambda \mu}^\Lambda \quad \text{für } \omega_r = 0\end{aligned}$$

$\Lambda$  beschreibt die Art der Wechselwirkung,  $\omega_{lm}^\Lambda$  ist die komplexe Amplitude und  $T_{\lambda \mu}^\Lambda$  sind nichtreduzierbare Tensoroperatoren vom Rang  $\lambda$  für die räumliche Rotation und Rang  $\mu$  für die Spinrotation. Die Quantenzahlen  $m$  und  $\mu$  können die Werte  $m = -l, -l+1, \dots, l$  bzw.  $\mu = -\lambda, -\lambda+1, \dots, \lambda$  annehmen, wobei  $l$  und  $\lambda$  durch die Art der Wechselwirkung festgelegt sind. Weiterhin beinhaltet  $\mathcal{H}_{int}$  nur Terme mit  $\mu = 0$ .

Die *Average Hamiltonian Theory* (AHT) [32; 109] erlaubt die einfachste Beschreibung des Hamiltonoperators bei symmetriebasierten Sequenzen. Diese benötigt eine Transformation in das rotierende Koordinatensystem des HF-Feldes. Dort gilt für den Hamilton-

operator allgemein:

$$\tilde{\mathcal{H}}(t_q) = \sum_{\Lambda l m \lambda \mu} \tilde{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda}(t_q)$$

mit

$$\tilde{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda}(t_q) = d_{\mu 0}^{\lambda}(-\beta_q) \omega_{lm}^{\Lambda} \exp(i\mu\gamma_q + i2\pi m\nu_r t_q) T_{\lambda\mu}^{\Lambda},$$

$d_{\mu 0}^{\lambda}$  sind reduzierte Wigner-Elemente,  $t_q$  beschreibt einen Zeitpunkt während der Einstrahlung des  $q$ -ten Basiselementes und  $(\alpha_q, \beta_q, \gamma_q)$  sind die HF-Eulerwinkel zum Zeitpunkt  $t_q$ . Unter Berücksichtigung der Konstruktionsvorschriften der Pulssequenzen kann man zeigen, dass für die HF-Eulerwinkel folgende Symmetrien gelten:

$$CN_n^{\nu} : \quad \beta_q = \beta_0, \quad \gamma_q = \gamma_0 - \frac{2\pi\nu}{N}q$$

$$RN_n^{\nu} : \quad \beta_q = \beta_0 + q\pi, \quad \gamma_q = \gamma_0 - \frac{2\pi\nu}{N}q$$

Dadurch erhält man

$$\tilde{\mathcal{H}}(t_q) = \sum_{\Lambda l m \lambda \mu} \tilde{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda}(t_0) \exp(i\frac{2\pi q}{N}(mn - \mu\nu))$$

für  $CN_n^{\nu}$ -Symmetrien bzw.

$$\tilde{\mathcal{H}}(t_q) = \sum_{\Lambda l m \lambda \mu} \tilde{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda}(t_0) \exp(i\frac{2\pi q}{N}(mn - \mu\nu - \frac{\lambda N}{2}))$$

für  $RN_n^{\nu}$ -Symmetrien. Mittels der AHT kann nun durch *Magnus-Entwicklung* der Hamiltonoperator aufgeteilt werden in

$$\overline{\mathcal{H}} = \overline{\mathcal{H}}^{(0)} + \overline{\mathcal{H}}^{(1)} + \overline{\mathcal{H}}^{(2)} + \dots$$

wobei uns hier nur der Term nullter Ordnung

$$\begin{aligned} \overline{\mathcal{H}}^{(0)} &= \sum_{\Lambda l m \lambda \mu} \overline{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda} \\ &= \sum_{\Lambda l m \lambda \mu} \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} dt \tilde{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^{\Lambda}(t) \end{aligned}$$

interessiert. Durch die Periodizität des Wechselwirkungshamiltonoperators erhält man damit die Auswahlregel

$$\begin{aligned} \text{CN}_n^\nu : \quad \overline{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^\Lambda &= 0 \quad \text{für } (mn - \mu\nu) \neq NZ, Z \in \mathbb{Z} \\ \text{RN}_n^\nu : \quad \overline{\mathcal{H}}_{lm\lambda\mu}^\Lambda &= 0 \quad \text{für } (mn - \mu\nu) \neq \frac{N}{2}Z_\lambda, \end{aligned}$$

mit der ganzen Zahl  $Z_\lambda$  der gleichen Geradzahligkeit wie  $\lambda$ . Spezielle Pulssequenzen sorgen dafür, dass nur Terme des Hamiltonoperators erhalten werden, für die es eine eindeutige Zuordnung der Quantenzahlpaare  $\{l, m\}$  zu den Paaren  $\{\lambda, \mu\}$  gibt. Diese Sequenzen werden  $\gamma$ -kodierte Sequenzen genannt [66].

Erweiterbar ist diese Methode auch auf die simultane Einstrahlung der HF-Pulssequenzen auf zwei verschiedene Kernarten („Zweikanal-Sequenzen“). Hierfür gibt es vier verschiedenen Möglichkeiten. In allen Fällen ist die Anzahl der Basiselemente  $N$  und die Anzahl der Rotationsperioden  $n$  der Sequenzen für beide Kerne  $S$  und  $K$  gleich, aber die Symmetrieklasse ( $C$  oder  $R$ ), das Basiselement und der Phaseninkrementparameter  $\nu$  kann sich unterscheiden. Folgende Kombinationen sind möglich:

- $S: \text{CN}_n^\nu, K: \text{CN}_n^\nu \rightarrow \text{CN}_n^{\nu_S, \nu_K}$
- $S: \text{CN}_n^\nu, K: \text{RN}_n^\nu \rightarrow \text{CRN}_n^{\nu_S, \nu_K}$
- $S: \text{RN}_n^\nu, K: \text{CN}_n^\nu \rightarrow \text{RCN}_n^{\nu_S, \nu_K}$
- $S: \text{RN}_n^\nu, K: \text{RN}_n^\nu \rightarrow \text{RN}_n^{\nu_S, \nu_K}$

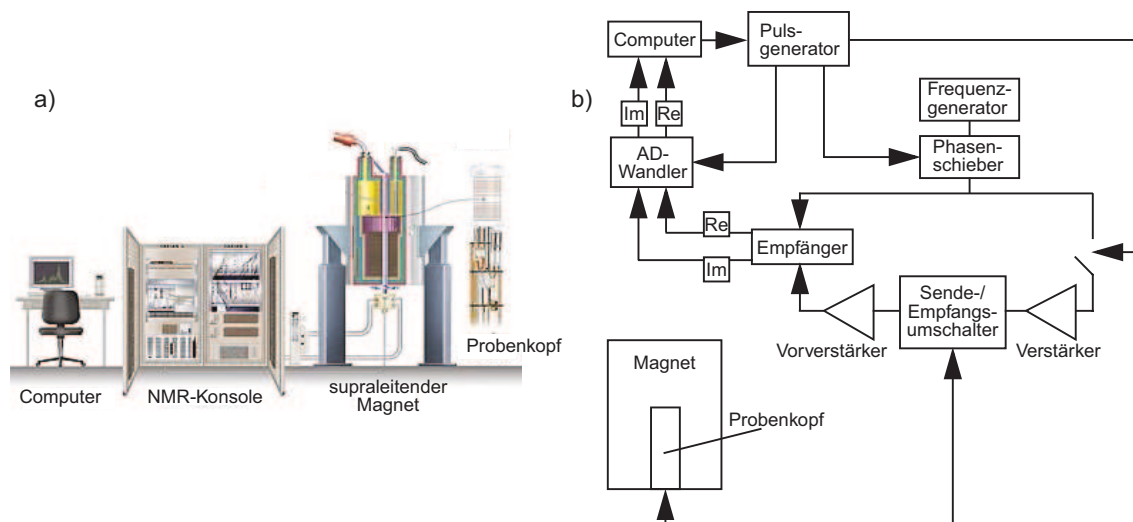
Da für die HF-Eulerwinkel analoge Symmetrien wie für die Einkanaleinstrahlung gelten, kann auch die Herleitung der Auswahlregeln analog erfolgen. Für die hier in dieser Arbeit verwendete  $\text{RN}_n^{\nu_S, \nu_K}$ -Symmetrie erhält man

$$\text{RN}_n^{\nu_S, \nu_K} : \quad \overline{\mathcal{H}}_{lm\lambda_S\mu_S\lambda_K\mu_K}^\Lambda = 0 \quad \text{für } (mn - \mu_S\nu_S - \mu_K\nu_K) \neq \frac{N}{2}Z_{\lambda_S+\lambda_K}.$$

## 2.7 NMR-Spektrometer

### 2.7.1 Supraleitender Magnet

Die Feldstärke des Magneten ist die prägendste Größe im Experiment, da die Empfindlichkeit des Spektrometers proportional zu  $B_0^{3/2}$  und die Auflösung des Spektrums proportional zu  $B_0$  ist. Aufgrunddessen werden NMR-Spektrometer durch einen mit flüssigem Stickstoff und Helium gekühlten supraleitenden Magnet realisiert, da die hohen



**Abb. 2.9:** (a) Experimenteller Aufbau ([www.varianinc.com](http://www.varianinc.com)) (b) Schematische Darstellung eines Einkanal-NMR-Spektrometers.

benötigten Feldstärken bei Verwendung konventioneller Magnetspulen enorme Kühlleistungen erfordern würden. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Homogenität des Magnetfeldes. Die relative Abweichung beträgt in Festkörper-NMR-Spektrometern nur  $10^{-7}$ , in Flüssigkeits-NMR-Spektrometern kann sogar  $10^{-10}$  erreicht werden. *Field-frequency-locking* sorgt für eine konstante  $B_0$ -Feldstärke und durch *shims* werden kleine Inhomogenitäten innerhalb des Probenkopfes korrigiert.

### 2.7.2 Probenkopf

Innerhalb des Magneten befindet sich der Probenkopf, welcher die Probe sowie Vorrichtungen zum Drehen der Probe enthält. Senkrecht zum Magnetfeld wird mittels einer Spule das Hochfrequenz-Feld (HF-Feld) eingestrahlt. Außerdem enthält der Probenkopf noch mehrere Schwingkreise, die in Resonanz gebracht werden müssen, um den Strom in der Spule, und somit auch das eingestrahlte HF-Magnetfeld, zu maximieren. Die einzelnen Schwingkreise können auf verschiedene Larmorfrequenzen abgestimmt werden, um mehrere Kerne gleichzeitig anzuregen und zu beobachten.

### 2.7.3 Sender

Der Sender produziert das hochfrequente Wechselfeld. Um verschiedene Kerne anzuregen, benötigt man verschiedene, von Frequenzgebern generierte, Trägerfrequenzen. Diese werden auch *Kanäle* genannt.

### 2.7.4 Empfänger

Das detektierte NMR-Signal ist der vom rotierenden Magnetisierungsvektor in der Spule induzierte Strom. Mit einer Spule kann nur das Signal von  $M_x$  oder  $M_y$  beobachtet

werden, man erhält:

$$S(t) = Ce^{-t/T_2} \cos(\omega_0 t + \phi)$$

Das Signal wird im Empfänger mit der Trägerfrequenz moduliert:

$$\begin{aligned} S'(t) &= \cos(\omega t) S(t) \\ &= \frac{1}{2} Ce^{-t/T_2} \left( \cos[(\omega_0 + \omega)t + \phi] + \cos[(\omega_0 - \omega)t + \phi] \right) \end{aligned}$$

Mit einem Tiefpassfilter wird die  $(\omega_0 + \omega)$  -Komponente herausgefiltert:

$$S''(t) = \frac{1}{2} Ce^{-t/T_2} \cos[(\omega_0 - \omega)t + \phi]$$

Man detektiert also eine Frequenz  $\Omega_0 = \omega_0 - \omega$  relativ zu der Trägerfrequenz. Dadurch kann aber das Vorzeichen der Präzessionsfrequenz nicht unterschieden werden. Dies wird durch eine sogenannte *Quadrature Detection* erreicht, bei der zwei um  $90^\circ$  phasenverschobene Detektoren verwendet werden. Die beiden Ausgangssignale werden auch als Real- und Imaginärteil bezeichnet, da daraus mittels komplexer Fouriertransformation ein Spektrum in Absorption generiert wird. Generell werden in NMR-Spektrometern keine zwei Empfängerspulen integriert. Trotzdem können phasenempfindliche Spektren unter Verwendung der Methode von States [100] generiert werden, welche auch in dieser Arbeit genutzt wurde.

### 2.7.5 AD-Wandler

Das Eingangssignal wird zur weiteren Analyse digitalisiert. Aus diesem Grund wird in regelmäßigen Abständen das Signal gemessen. Dabei bestimmt die Länge des Intervalls (*dwell time*) die maximal zu detektierende Frequenz (*Nyquist-Frequenz*,  $\nu_n = \frac{1}{2\Delta t}$ ) und die beobachtbare Spektralbreite ( $\nu = \frac{1}{\Delta t}$ ).

### 2.7.6 Computer

Das digitalisierte NMR-Signal wird im Computer gespeichert und mittels Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt.

### 2.7.7 Verwendete Spektrometer

Experimentelle Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit einem 500 MHz *wide-bore Varian* <sup>UNITY</sup> INOVA- (Kap. 3) bzw. einem 500 MHz *wide-bore Bruker Avance III*-Festkörper-NMR-Spektrometer (Kap. 4-8) durchgeführt. Dabei wurde ein 3.2 mm *Chemagnetics triple*



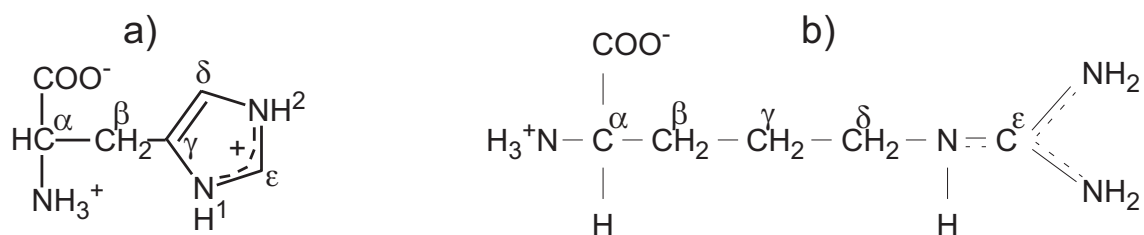


Abb. 2.10: a) L-Histidin, b) L-Arginin

resonance- (Kap. 3), ein 2.5 mm Bruker triple resonance- (Kap. 4-6) beziehungsweise ein 3.2 mm Bruker triple resonance-Probenkopf (Kap. 7 und 8) verwendet.

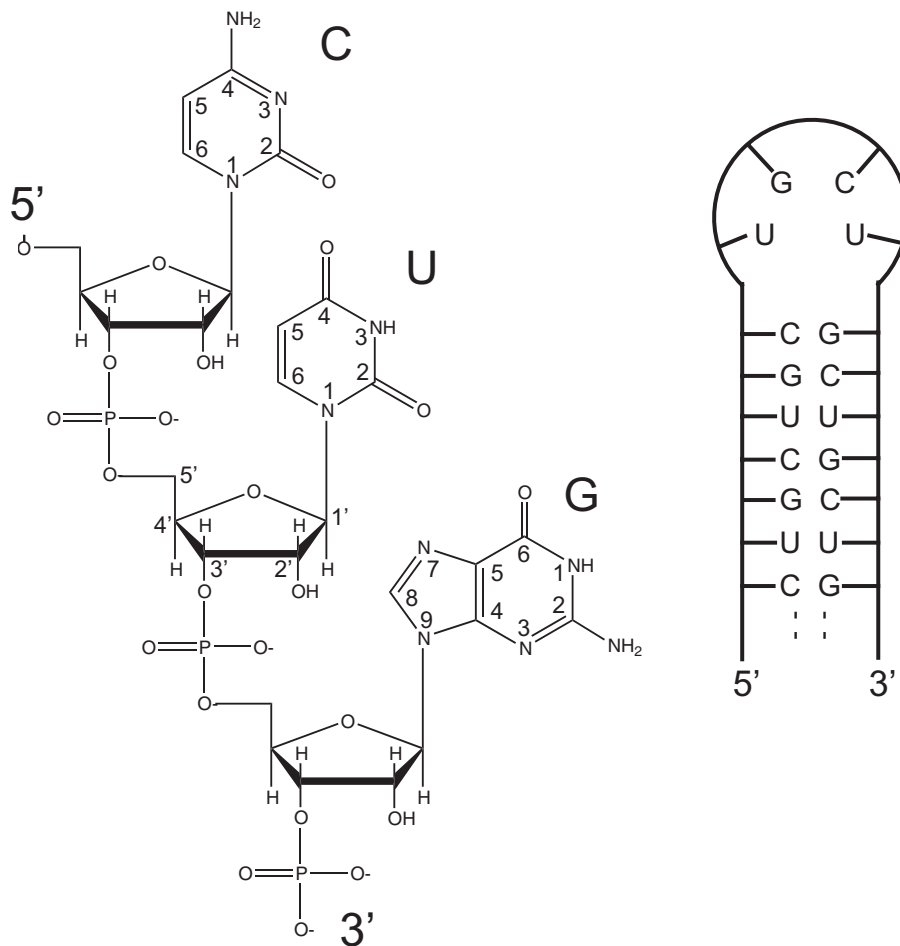
## 2.8 Verwendete Proben

L-Histidin (Abb. 2.10a) ist eine der 20 natürlichen eiweißbildenden Aminosäuren. Es kommt in fast allen Proteinen vor und ist häufig in katalytischen Zentren von Proteinen essentiell, zum Beispiel zur Komplexbildung von Metallen und als Akzeptor bzw. Donor von Protonen während der Katalyse in Proteasen und anderen Enzymen.

Eine weitere untersuchte Aminosäure ist L-Arginin (Abb. 2.10b). Es ist eine Quelle energiereicher Stickstoff-Phosphat-Verbindungen in Organismen und für den Menschen semi-essentiell. So ist L-Arginin die alleinige Vorstufe von Stickstoffmonoxid, einem der Botenstoffe im menschlichen Körper.

(CUG)<sub>97</sub> (Abb. 2.11) ist ein *triplet expansion repeat* RNA-Molekül, das aus 97 CUG-Wiederholungen besteht. Diese CUG-Wiederholungen binden und sequestrieren *muscleblind* (MBNL) Proteine [47; 73], was zum Verlust der MBNL-Funktionen und damit zu fehlerhaften Prozessierungen von prä-mRNAs, welche für die Muskelzelle wichtige Prozesse kodieren, führt. Als Beispiel ist hier die fehlerhafte Prozessierung der prä-mRNA für den Chlorid-Kanal (CIC-1) des Skelettmuskels zu nennen. Die Folgen sind der Verlust der normalen Chlorid-Leitfähigkeit und Hyperexzitabilität (Myotonie) [19; 70].

Zum Verständnis, warum die CUG-Wiederholungen MBNL-Proteine binden, ist die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur nötig. Dies soll auch die Grundlage für anschließende Untersuchungen des RNA-Protein-Komplexes bilden. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von ca. 100 kDa sind Untersuchungen des (CUG)<sub>97</sub>-Moleküls in flüssiger Phase nicht möglich, weswegen Festkörper-NMR-Spektroskopie notwendig ist [64; 84; 87–90]. Die RNA wird *in vitro* aus <sup>15</sup>N- und <sup>13</sup>C-markierten Ribonukleosid-Triphosphaten (rNTPs) synthetisiert, zur Homogenität aufgereinigt und mittels eines Denaturierungs-Renaturierungsverfahren gefaltet. Um das RNA-Molekül für Festkörper-NMR-Untersuchungen vorzubereiten, wird es gefriergetrocknet, in Wasserdampf-gesät-



**Abb. 2.11:** Schema des Basentriplets CUG und eines (CUG)<sub>n</sub>-Doppelstrangs mit Haarnadelschleife

tigter Atmosphäre rehydratisiert und bei -15°C eingefroren. Die in dieser Arbeit verwendete (CUG)<sub>97</sub>-Probe wurde von Sabine Häfner aus unserer Arbeitsgruppe hergestellt und freundlicherweise für die Messungen zur Verfügung gestellt wurde.

Alle untersuchten Proben waren einheitlich <sup>13</sup>C-/<sup>15</sup>N-markiert, wobei L-Histidin und L-Arginin in polykristalliner Form vorlag.

## Kapitel 3

# Korrelationsexperimente ohne $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit mit adiabatischen Pulsen

### 3.1 Einleitung

Homonukleare Korrelationsexperimente der chemischen Verschiebung werden allgemein in MAS-Festkörper-NMR-Studien an biomolekularen Systemen wie Proteinen und Nukleinsäuren für Resonanzzuordnungen und zur Bestimmung von strukturellen Einschränkungen verwendet. So wird das charakteristische Konnektivitätsmuster in einem  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum im Allgemeinen genutzt, um Kohlenstoffresonanzen, die zu einer spezifischen Klasse von Resten (zum Beispiel einer bestimmten Sorte von Aminosäuren eines Peptides/Proteins oder eines Zuckerrestes einer Nukleinsäure) gehören, zuzuordnen. Da schwache dipolare Kopplungen zwischen Kernen mit geringem gyromagnetischen Verhältnissen normalerweise bei schnellen Drehgeschwindigkeiten nicht messbar sind, wurden effiziente dipolare Rückkopplungsschemata entwickelt, welche die räumliche Mittelung dipolarer Kopplungen in rotierenden Festkörperproben unterbinden [9; 23; 29; 66]. Diese erlauben die Aufnahme von Korrelationsspektren sowohl mittels longitudinaler als auch transversaler Magnetisierungsübertragung, wobei letztere ein um den Faktor  $\sqrt{2}$  besseres Signal-Rausch-Verhältnis und einen schnelleren Aufbau der Kreuzsignalintensitäten bewirkt [104]. *Total through-bond correlation spectroscopy* (TOBSY) findet auch einige Anwendung in  $^{13}\text{C}$ -Resonanzzuordnungen in Festkörpern [1; 5; 22; 34; 37]. Hierbei wird die Korrelation der chemischen Verschiebung ausnahmslos via skalarer Kopplungen erreicht, welche zu einer kompletten Magnetisierungsübertragung von Spin zu Spin und somit zu größeren Kreuzsignalintensitäten führen können. Aufgrund der starken dipolaren  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen wird üblicherweise  $^1\text{H}$  während der Mischzeit entkoppelt. Falls das Verhältnis der Entkopplungs- zu den Rückkopp-

lungsfeldstärken nicht groß genug ( $>3:1$ ) ist, kann es zu Signalverlusten aufgrund der Interferenz zwischen diesen beiden Feldern kommen [8]. Kürzlich wurde gezeigt, dass es ebenso möglich ist,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung gänzlich ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit zu generieren [6; 43; 71; 74; 77; 92], um solche Interferenzen zu vermeiden. Dabei muss die verwendete HF-Mischsequenz nicht nur effizienten Magnetisierungsübertrag zwischen dipolar/skalar gekoppelten Kohlenstoffen gewährleisten, sondern auch die Protonen entkoppeln. Auch mittels adiabatischen tanh/tan-Inversionspulsen [44] wurde dieses Prinzip erfolgreich angewandt [92]. Der tanh/tan-Puls wurde extensiv in MAS-Festkörper-NMR-Untersuchungen verwendet [38; 49; 62; 63; 85–87; 91]. Allerdings hat dieser Puls einen hohen HF-Leistungsfaktor (*power factor*,  $\text{PF} = (B_{1,\text{rms}}/B_{1,\text{max}})^2$ , mit  $B_{1,\text{rms}}$  als quadratisches Mittel der HF-Feldstärke) und Korrelationsexperimente ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit benötigen im Allgemeinen sehr große  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken ( $>100$  kHz) [92]. Deswegen ist absehbar, dass Mischsequenzen basierend auf solchen Pulsen eine erhebliche Gefahr für die Probe und die NMR-Hardware darstellen, besonders in Situationen, in denen lange Mischzeiten benötigt werden, wie zum Beispiel bei Abstandsmessungen weiter entfernter Kerne. In diesem Kontext wurden die Möglichkeiten untersucht,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung bei reduziertem HF-Leistungsfaktor zu generieren. Pulssequenzen unter Verwendung adiabatischer Inversionspulse mit verschiedenen Amplituden- und Frequenzmodulationsprofilen wurden für longitudinale sowie transversale Magnetisierungsübertragung evaluiert. Die Wirksamkeit wurde mittels numerischer Simulationen und experimenteller Messungen beurteilt. Die Resultate dieser Untersuchungen werden in diesem Kapitel präsentiert.

### 3.1.1 Adiabatische Inversionspulse

Das effektive Feld bei Einstrahlung eines HF-Feldes  $\vec{B}_1$  setzt sich aus  $\omega_1 = \gamma B_1$  und dem Resonanzoffset  $\Delta\omega = \gamma\Delta B_0$  zusammen und bildet einen Winkel  $\theta$  mit der  $x$ -Achse. Falls die adiabatische Bedingung  $\|d\theta/dt\| \ll \omega_{\text{eff}}$  erfüllt ist, also die Änderung von  $\theta$  langsam erfolgt im Vergleich zur Präzession der Spins um das effektive Feld, dann ist der Winkel  $\alpha$  zwischen dem Vektor des effektiven Feldes und der Richtung der nuklearen Magnetisierung zeitlich konstant, die Magnetisierung folgt dem effektiven Feld. Aus dem adiabatischen Faktor

$$Q = \frac{\omega_{\text{eff}}}{\|d\theta/dt\|} = \frac{(\omega_1^2 + \Delta\omega^2)^{\frac{3}{2}}}{\omega_1(d\Delta\omega/dt) - \Delta\omega(d\omega_1/dt)}$$

erkennt man, dass adiabatische Änderungen durch Frequenzänderung ( $d\Delta\omega/dt$ ) oder Amplitudenänderung ( $d\omega_1/dt$ ) verwirklicht werden können. Vollständige Inversion wird erreicht, wenn das effektive Feld, und damit auch der Magnetisierungsvektor, entlang der  $+z$ -Achse startet und entlang der  $-z$ -Achse endet. Offensichtlich ist es deswegen nötig, symmetrische Amplitudenprofile zu verwenden, die an den Enden asymptotisch gegen 0 gehen.

Adiabatische Pulse sind ab einem bestimmten  $B_1$ -Grenzwert tolerant gegen Feldstärkeinhomogenitäten und besitzen eine große Bandbreite.

### 3.1.2 RFDR

*Radio-frequency driven recoupling* (RFDR) [7; 8] ist die meistverwendete Nullquanten-Rückkopplungssequenz und besteht aus einer Serie von  $\pi$ -Pulsen in Abständen von Vielfachen der Rotationsperiode. Sie wird in Strukturuntersuchungen von Peptiden und Proteinen [11; 95] sowie anorganischen Phosphaten [102] eingesetzt. Allerdings hängt die Effektivität, mit der der gewünschte ZQ-Hamiltonoperator erzeugt wird, vom Verhältnis der Pulslänge des Rechteckpulses zur Rotationsperiode ab [45].

### 3.1.3 TOBSY

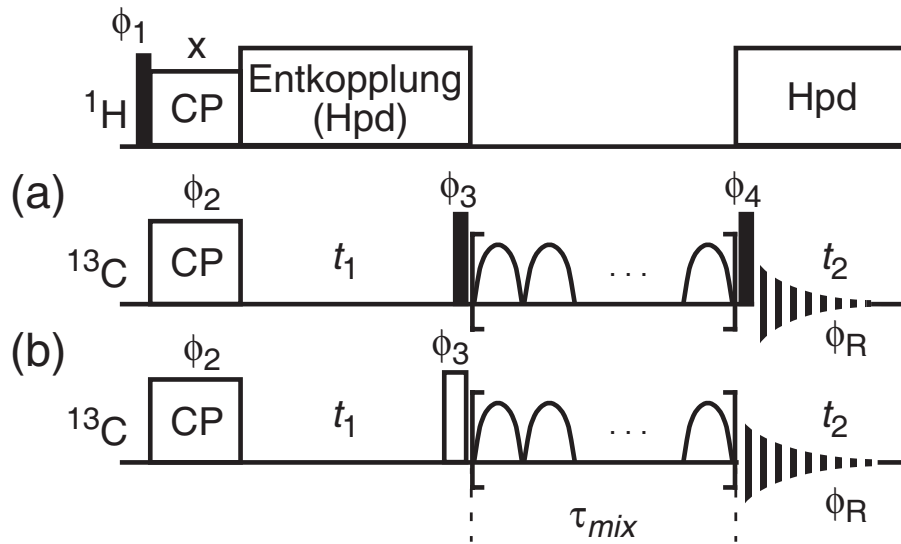
Mittels *total through-bond correlation spectroscopy* (TOBSY) kann man durch Ausnutzung der skalaren Kopplung leicht Aussagen über Bindungspartner innerhalb eines Moleküls treffen, da die skalare Wechselwirkung nur zwischen gebundenen Kernen auftritt. Die Summe der Magnetisierung der verschiedenen Spins bleibt unter dem Einfluss des entsprechenden Hamiltonoperators konstant, nur die Differenz entwickelt sich nach

$$(I_{jz} - I_{kz}) \rightarrow (I_{jz} - I_{kz}) \cos(2\pi J_{jk}\tau) + (I_{jy}I_{kx} - I_{jx}I_{ky}) \sin(2\pi J_{jk}\tau)$$

Dieses oszillierende Verhalten bewirkt einen resultierenden Magnetisierungsübergang zwischen den Spins:

$$\begin{aligned} I_{jz} \rightarrow & \frac{1}{2}I_{jz}(1 + \cos(2\pi J_{jk}\tau)) + \frac{1}{2}I_{kz}(1 - \cos(2\pi J_{jk}\tau)) \\ & + (I_{jy}I_{kx} - I_{jx}I_{ky}) \sin(2\pi J_{jk}\tau) \end{aligned}$$

mit analogen Ausdrücken für die transversalen Komponenten, da der Hamiltonoperator isotrop ist. Nach einer Mischzeit  $\tau = \frac{1}{2J_{jk}}$  ist die Magnetisierung vollständig von Spin  $j$  auf Spin  $k$  übergegangen. Aufgrund der im Vergleich zur dipolaren Kopplung sehr ge-



**Abb. 3.1:** CPMAS-HF-Pulssequenz zum Generieren von  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung mittels adiabatischer Mischsequenzen. Schema (a) bzw. (b) wurde für Experimente mit longitudinalem bzw. transversalem Mischen genutzt. Schwarze bzw. weiße Rechtecke repräsentieren jeweils  $180^\circ$ - bzw.  $90^\circ$ -Pulse. Um phasempfindliche Spektren mittels Schema (b) zu generieren, wurden Daten mit und ohne den  $^{13}\text{C}$ - $180^\circ$ -Puls am Ende der  $t_1$ -Zeit aufgenommen [104]. Two-pulse phase-modulated (TTPM)-Entkopplung [10] wurde während  $t_1$  und  $t_2$  verwendet. Die Phasenzyklen der HF-Pulse und Empfängerphasen: (a)  $\phi_1 = (y, -y)$ ;  $\phi_2 = (x)$ ;  $\phi_3 = (2^*y, 2^*-y)$ ;  $\phi_4 = (4^*y, 4^*-y)$ ;  $\phi_R = (x, -x, -x, x, -x, x, x, -x)$ ; (b)  $\phi_1 = (y, -y)$ ;  $\phi_2 = (x)$ ;  $\phi_3 = (y)$ ;  $\phi_R = (x, -x)$

ringen Kopplungsstärke  $J$  sind die Mischzeiten für TOBSY-Experimente im Allgemeinen deutlich länger.

In symmetriebasierten TOBSY-Sequenzen werden nur Terme mit  $(l, m, \lambda, \mu) = (0, 0, 0, 0)$  und  $(0, 0, 1, 0)$  erlaubt, welche der skalaren Wechselwirkung sowie der isotropen chemischen Verschiebung entsprechen.

### 3.2 Numerische und experimentelle Methoden

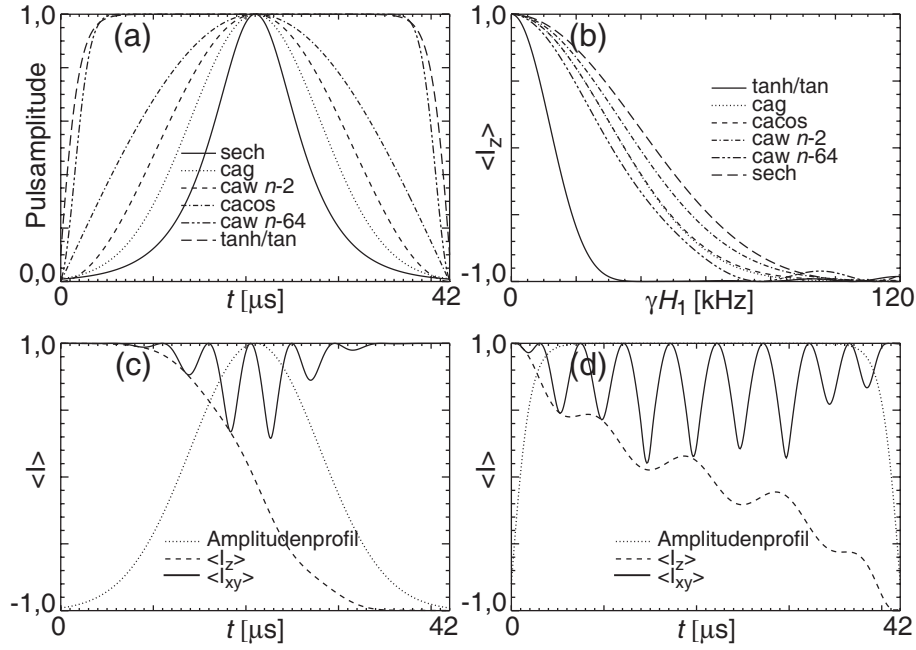
$^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung wurden durch Vermittlung von skalaren bw. dipolaren Kopplungen erzeugt. Die verwendeten HF-Pulssequenzen sind in Abb. 3.1 zu sehen. Im Experiment, welches auf longitudinalem Magnetisierungsaustausch basiert (Abb. 3.1a), wird entweder die  $x$ - oder die  $y$ -Magnetisierungskomponente am Ende der  $t_1$ -Zeit durch Festlegen der Phase  $\phi_3$  ausgewählt. Diese Magnetisierungskomponente wird dann zu  $z$ -Magnetisierung umgewandelt und anschließend während der Mischzeit auf die dipolar/skalar gekoppelten Spins übertragen, bevor das Signal detektiert wird. Dipolare Korrelationsexperimente, welche auf transversalem Magnetisierungsaustausch aufbauen (Abb. 3.1b), erlauben die Verwendung beider  $x$ - und  $y$ -Magnetisierungskomponenten am Ende von  $t_1$ . Dadurch tragen beide Komponenten zu jedem freien Induktionszerfall in  $t_2$  bei [104]. Die verwendeten dipolaren Mischse-

quenzen beinhalten die Einstrahlung eines adiabatischen Pulses in der Mitte jeder Rotationsperiode (RFDR-Sequenz). TOBSY-Spektren wurden unter Verwendung der symmetriebasierten R32<sub>28</sub><sup>3</sup>-Mischsequenz [66; 92] mittels longitudinalem Magnetisierungsaustausch generiert. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur an einer L-Histidin-Probe durchgeführt. Alle Spektren wurden unter Hochleistungsentkopplung in der  $t_1$ - und  $t_2$ -Dimension, aber ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit aufgenommen. Numerische Simulationen wurden mittels des SIMPSON-Programms [3] durchgeführt. Zur Mittelung über die Kristallorientierungen wurden 168 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-Pulverwinkelpaare nach dem REPULSION-Schema [4] und 16  $\gamma$ -Winkel gewählt. Falls nicht anders angegeben, wurde dieses Schema auch in allen folgenden Kapiteln verwendet. Die Länge der verwendeten Inversionspulse  $t_p$  war durch die Drehgeschwindigkeit und Mischsequenz festgelegt. Die anfängliche Geschwindigkeit der Magnetisierungsübertragung ist ein Maß für die Effizienz der Mischsequenz. Aufgrunddessen wurde zur Bewertung der einzelnen Sequenzen die Größe der auf den zweiten Spin ( $^{13}\text{C}'$ ,  $^{13}\text{C}^\beta$ ) übertragenen Magnetisierung in Abhängigkeit von der Mischzeit, beginnend mit der entsprechenden Magnetisierung des ersten Kohlenstoffspins ( $^{13}\text{C}^\alpha$ ), simuliert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Simulationen in einem  $^1\text{H1}$ - $^{13}\text{C1}$ - $^{13}\text{C2}$ - $^1\text{H2}$ -Spinsystem unter expliziter Berücksichtigung heteronuklearer dipolarer  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen durchgeführt. Weitere Details sind den Bildunterschriften zu entnehmen.

Neben den tanh/tan-Pulsen wurden die Experimente auch mit hyperbolischen Sekant-(sech), *constant adiabacity*-Gauss- (cagauss), -Kosinus- (cacos) und -Wurst- (cawurst) Inversionspulsen durchgeführt. Diese Inversionspulse, deren Amplituden- und Frequenzprofil in der Fachliteratur dokumentiert sind [55], wurden mittels der Varian-Software Pbox generiert.

### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

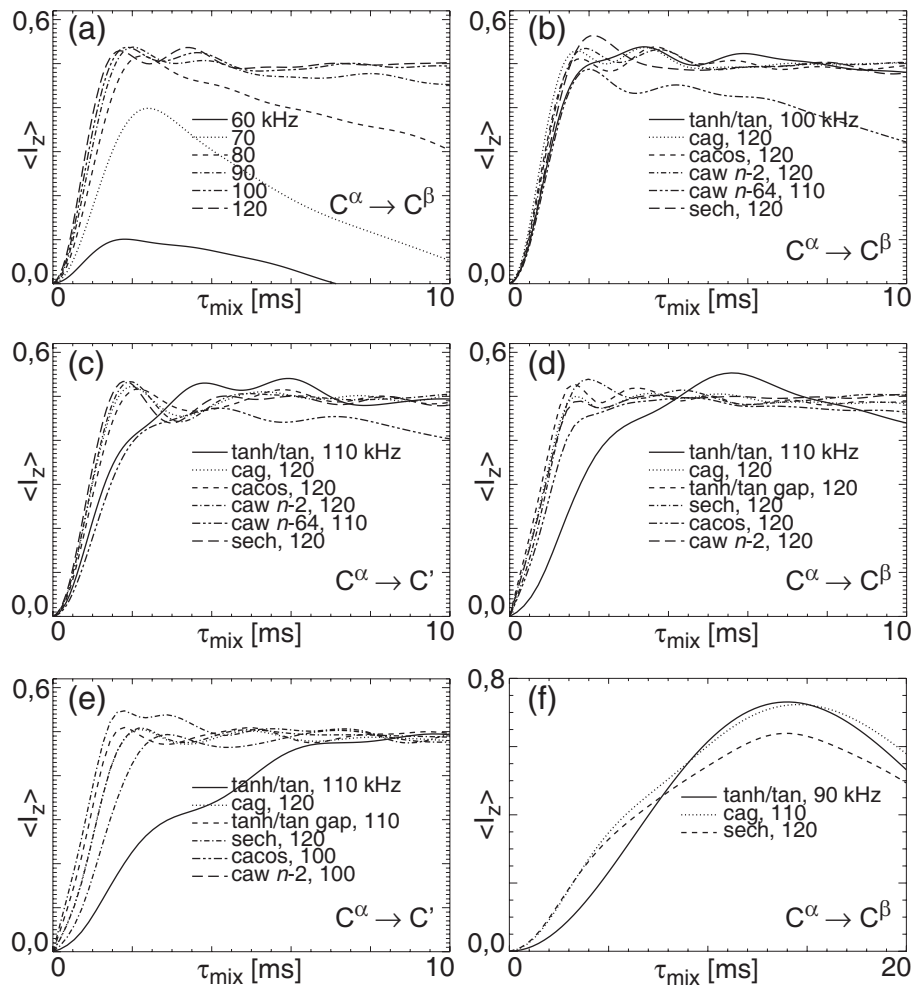
Abb. 3.2a zeigt die verschiedenen in diesem Kapitel verwendeten Inversionspulse. Der HF-Leistungsfaktor dieser Pulse umfasst eine große Spanne von Werten. Der Maximalwert von  $\approx 0,9$  entspricht dem tanh/tan-Puls, den Minimalwert  $\approx 0,18$  besitzt der sech-Puls. Wie man anhand von Ein-Spin-Simulationen (unter Vernachlässigung von CSA-Parametern) sehen kann, ermöglichen die adiabatischen Pulse eine effiziente Invertierung der longitudinalen Magnetisierungskomponente über eine große Bandbreite. Mit Ausnahme des tanh/tan-Pulses benötigen sie typischerweise eine große minimale HF-Feldstärke für zufriedenstellende Invertierung (Abb. 3.2b). Abb. 3.2c und d zeigen die



**Abb. 3.2:** Adiabatische Inversionspulse und deren Leistungscharakteristika: (a) Amplitudenprofile der Inversionspulse  $\tanh/\tan$  ( $PF \approx 0,9$ ), cagauss (Durchstimmbereich  $\Delta\omega_{\max} = 200$  kHz,  $PF \approx 0,29$ ), cacos ( $\Delta\omega_{\max} = 350$  kHz,  $PF \approx 0,5$ ), cawurst mit dem Pulsparameter  $n=2$  und  $n=64$  ( $\Delta\omega_{\max} = 350$  kHz,  $PF \approx 0,38$  bzw.  $0,88$ ), und hyperbolischer Sekant-Puls ( $\Delta\omega_{\max} = 200$  kHz,  $PF \approx 0,18$ ) mit Längen von  $42 \mu\text{s}$ ; (b) Inversionseffizienz als Funktion der HF-Feldstärke; (c) und (d) zeitliche Entwicklung der Magnetisierungs-komponenten  $\langle I_z \rangle$  und  $\langle I_{xy} \rangle$  während des (c) cagauss- bzw. (d)  $\tanh/\tan$ -Pulses von  $42 \mu\text{s}$  Länge, ausgehend von longitudinaler bzw. transversaler ( $\langle I_y \rangle$ ) Magnetisierung

zeitliche Entwicklung der longitudinalen und transversalen Magnetisierungskomponenten während der Einstrahlung des adiabatischen Pulses an zwei repräsentativen Beispielen. Die HF-Feldstärkeanforderung für effektive Magnetisierungsübertragung der Inversionspulse unterscheiden sich kaum, ein Mindestwert der HF-Feldstärke von  $\approx 100$  kHz oder mehr wird in allen Fällen benötigt. Als Beispiel sieht man in Abb. 3.3a die HF-Feldstärkeabhängigkeit der  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}^\beta$ -Magnetisierungsübertragung einer dipolaren Mischsequenz unter Verwendung von cagauss-Inversionspulsen bei einer Drehfrequenz von  $23,810$  kHz. Abb. 3.3b-e zeigen die Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung bei Drehfrequenzen von  $23,810$  kHz (Abb. 3.3b und c) und  $11,111$  kHz (Abb. 3.3d und e) unter Verwendung verschiedener adiabatischer Mischsequenzen. Aus diesen graphischen Darstellungen ist ersichtlich, dass adiabatische Mischsequenzen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor genutzt werden können, ohne die dipolare Rückkopplungswirksamkeit im Vergleich zum  $\tanh/\tan$ -Puls zu beeinträchtigen. Bei transversalen dipolaren Mischsequenzen sieht man jedoch, dass der adiabatische  $\tanh/\tan$ -Puls hinsichtlich der maximalen Magnetisierungsübertragung auf den zweiten Spin überlegen ist (Abb. 3.4). Abb. 3.3f zeigt die Charakteristika der symmetriebasierten TOBSY-Pulssequenz  $\text{R}32_{28}^3$  unter Benutzung verschiedener adiabatischer Pulse.



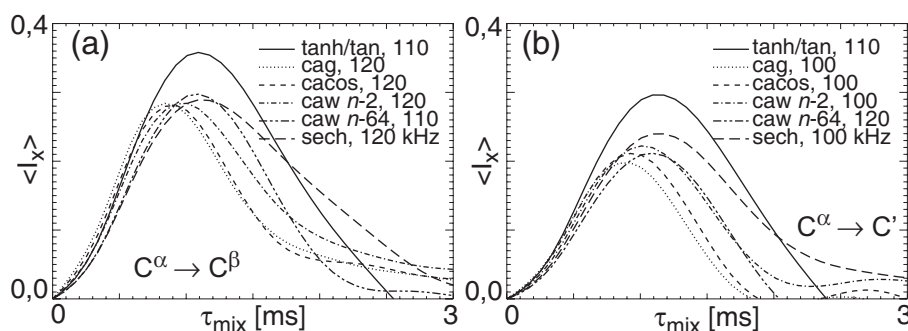


**Abb. 3.3:** Simulierte Leistungscharakteristika adiabatischer Mischsequenzen ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. (a) HF-Feldstärkeabhängigkeit der Magnetisierungsübertragung, beginnend mit longitudinaler Magnetisierung, unter Verwendung des m8-Phasenschema [65] mit cagauss-Inversionspulsen von  $42 \mu\text{s}$ , für eine Drehfrequenz von 23,810 kHz; (b-d) Darstellung der Magnetisierungsübertragungen, beginnend mit longitudinaler Magnetisierung, unter Verwendung des m8-Phasenschema, bei Drehfrequenzen von (b,c) 23,810 kHz und 11,111 kHz (d,e) mit verschiedenen adiabatischen Mischsequenzen, unter Einstrahlung eines Pulses pro Rotationsperiode. Der Magnetisierungsübertrag von  $40 \mu\text{s}$  tanh/tan-Pulsen zentriert in der Mitte einer Rotationsperiode ist zusätzlich gegeben (tanh/tan gap); (f) Charakteristika der TOBSY-Magnetisierungsübertragung, beginnend mit longitudinaler Magnetisierung, unter Verwendung der  $\text{R}28_{32}^3$ -Pulssequenz, für eine Drehfrequenz von 23,810 kHz mit verschiedenen adiabatischen Mischsequenzen unter Verwendung von Inversionspulsen von  $36,75 \mu\text{s}$  Länge. Die korrespondierenden  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken sind jeweils angegeben.

Die Simulationen für die  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}^\beta$ -Magnetisierungsübertragung wurden durchgeführt unter Verwendung eines  $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1\text{-}^{13}\text{C}2\text{-}^1\text{H}2$ -Netzwerks (wobei sich alle Kerne in einer Ebene befinden) und die  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$ -Magnetisierungsübertragung wurde mittels eines  $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1\text{-}^{13}\text{C}2$ -Netzwerks simuliert. Eine  $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ -Kopplungsstärke von 20 kHz wurde verwendet. Es wurde angenommen, dass sich die  $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ -Kopplungen in einem Winkel von  $109^\circ$  in Bezug auf den  $^{13}\text{C}\text{-}^{13}\text{C}$ -Vektor befinden. Die Simulationen wurden mit einer  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 110 ppm durchgeführt. Folgende Parameter wurden für das Spinsystem verwendet [14]:

Alanin: ( $^{13}\text{C}^\alpha$ : isotrope chemische Verschiebung  $\delta_{\text{iso}} = 50,9 \text{ ppm}$ ; Anisotropie der chemischen Verschiebung  $\delta_{\text{aniso}} = -19,67 \text{ ppm}$ ; Asymmetrieparameter  $\eta = 0,437$ ; Orientierung  $\Omega_{\text{PM}} = \{81,7^\circ; 24,5^\circ; 29,1^\circ\}$ ;  $^{13}\text{C}^\beta$ :  $\delta_{\text{iso}} = 20 \text{ ppm}$ ;  $\delta_{\text{aniso}} = -11,7 \text{ ppm}$ ;  $\eta = 0,76$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{-52,9^\circ; 77,4^\circ; 14,5^\circ\}$ ; Dipolare Kopplungsstärke  $D = 2156 \text{ Hz}$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 0^\circ\}$ ; J-Kopplung  $J = 35 \text{ Hz}$ )

Glyzin: ( $^{13}\text{C}^\alpha$ :  $\delta_{\text{iso}} = 45 \text{ ppm}$ ;  $\delta_{\text{aniso}} = -19,43 \text{ ppm}$ ;  $\eta = 0,98$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{99,4^\circ; 146,0^\circ; 138,9^\circ\}$ ;  $^{13}\text{C}'$ :  $\delta_{\text{iso}} = 178,2 \text{ ppm}$ ;  $\delta_{\text{aniso}} = -74,5 \text{ ppm}$ ;  $\eta = 0,88$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{-0,7^\circ; 88,5^\circ; 52,5^\circ\}$ ;  $D = 2135 \text{ Hz}$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 0^\circ\}$ ;  $J = 53,1 \text{ Hz}$ )

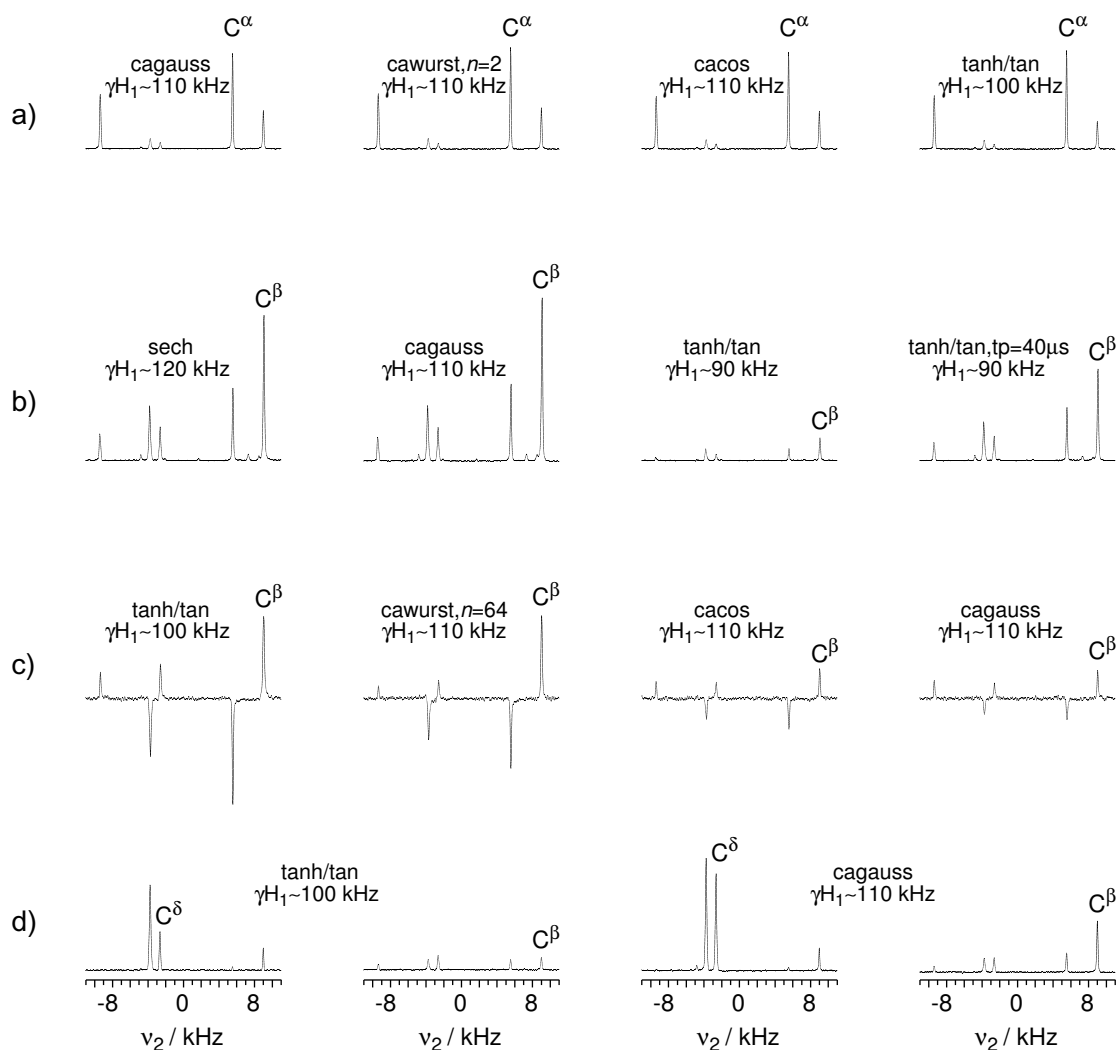


**Abb. 3.4:** Darstellung der Magnetisierungsübertragung der transversalen Mischsequenz ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit, beginnend mit transversaler ( $\langle I_x \rangle$ ) Magnetisierung, unter Verwendung des m8-Phasenschema, für eine Drehfrequenz von 23,810 kHz mit verschiedenen adiabatischen Mischsequenzen unter Verwendung von Inversionspulsen von 42  $\mu\text{s}$  Länge. Die korrespondierenden  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken sind angegeben. Andere Parameter analog zu Abb. 3.3.

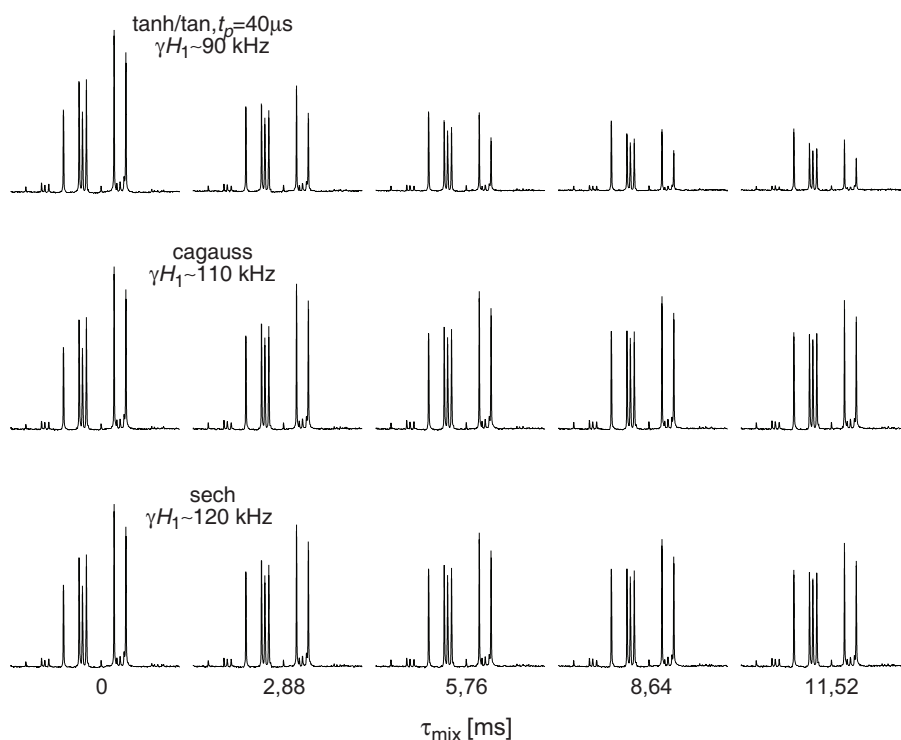
Unter Verwendung von Inversionspulsen mit niedrigem PF-Wert, wie zum Beispiel ca-gauss, ist es möglich, einen zufriedenstellenden  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}^\beta$ -TOBSY-Transfer zu erreichen. Die  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$ -Magnetisierungsübertragung ist aber bereits mit  $^1\text{H}$ -Entkopplung unzureichend, infolgedessen wurde auf eine Untersuchung des  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$ -Transfers in Experimenten ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung verzichtet.

$^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimente mit L-Histidin wurden unter Benutzung adiabatischer Mischsequenzen mittels longitudinalem sowie transversalem Magnetisierungsaustausch durchgeführt. Die 2D-Spektren zeigen alle erwarteten Kreuzsignale, welche durch direkte sowie weitergeleitete Magnetisierungsübertragung hervorgerufen wurden (Daten nicht gezeigt). Im Allgemeinen stimmten die experimentellen HF-Feldstärkeanforderungen für zufriedenstellende Leistung mit den numerischen Simulationen überein ( $>100$  kHz). Abb. 3.5 zeigt Querschnitte aus den jeweiligen 2D-Korrelationsspektren an der angegebenen Diagonalsignalposition. Klar ersichtlich ist, dass die Nutzung von Inversionspulsen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor für dipolaren longitudinalen Magnetisierungsaustausch die beobachteten Signalintensitäten nicht negativ beeinflussen. Hervorzuheben sind hier vor allem die Intensitäten bei einer Drehfrequenz von 11,111 kHz, die deutlich höher als unter Verwendung von tanh/tan-Pulsen ausfallen (Abb. 3.5b). Noch deutlicher sind die Vorteile bei Verwendung längerer Mischzeiten zu erkennen (Abb. 3.6).

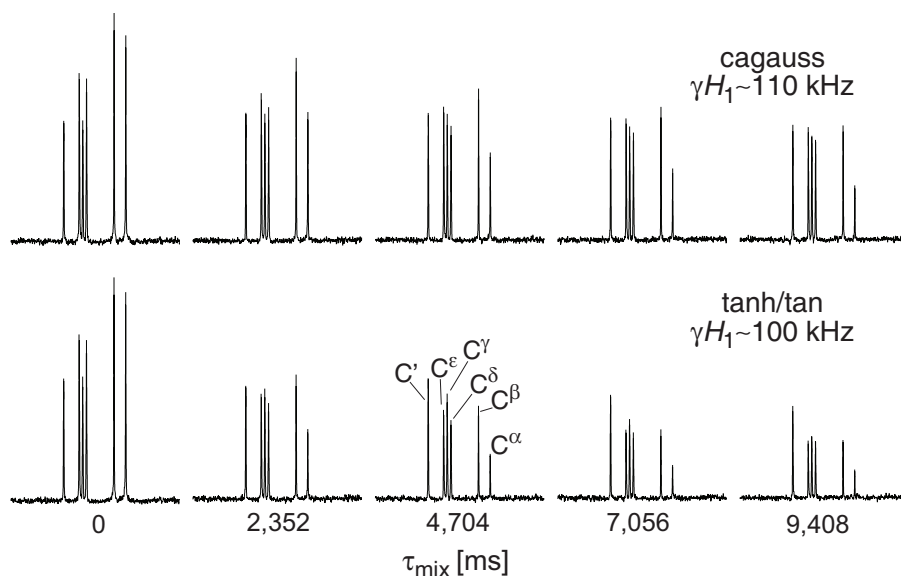
In den mittels transversaler dipolarer Mischsequenzen generierten Spektren erscheinen direkte und weitergeleitete Kreuzsignale mit gegensätzlichen Signalintensitäten [104]. Im Gegensatz zu den Resultaten bei longitudinalem Magnetisierungsaustausch, ist an den Querschnitten (Abb. 3.5c) erkennbar, dass die Nutzung von tanh/tan-Pulsen in transver-



**Abb. 3.5:** Spektrale Querschnitte an den angegebenen Diagonalsignalpositionen von 2D- $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung, generiert unter identischen experimentellen Bedingungen mittels verschiedener adiabatischer Inversionspulse ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. Alle Querschnitte in einer Reihe wurden mit gleicher vertikaler Skalierung gezeichnet. Falls nicht anders erwähnt, wurden die 2D-Korrelationsspektren mit 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 256  $t_1$ -Inkrementen, einer  $\omega_1$ -Spektralbreite von 50000 Hz und einer Regenerierungszeit von 2 s generiert. Bei einer Drehfrequenz von 11,111 kHz wurde eine Regenerierungszeit von 3 s verwendet. In dipolaren Korrelationsspektren mittels transversalem Mischen wurden 32 Scans pro  $t_1$ -Inkrement und 128  $t_1$ -Inkmente genutzt. TOBSY-Spektren wurden mit 224  $t_1$ -Inkrementen generiert. (a) RFDR, longitudinale Mischsequenz,  $\nu_r=23,810$  kHz,  $\tau_{\text{mix}}=4,032$  ms,  $t_p=42$   $\mu\text{s}$ , m8-Phasenschema. (b) RFDR, longitudinale Mischsequenz,  $\nu_r=11,111$  kHz,  $\tau_{\text{mix}}=5,76$  ms,  $t_p=90$   $\mu\text{s}$ , m8-Phasenschema. (c) RFDR, transversale Mischsequenz,  $\nu_r=23,810$  kHz,  $\tau_{\text{mix}}=1,008$  ms,  $t_p=42$   $\mu\text{s}$ , m8-Phasenschema. (d) TOBSY-Mischsequenz R32 $^3_{28}$ ,  $\nu_r=23,810$  kHz,  $\tau_{\text{mix}}=7,056$  ms,  $t_p=36,75$   $\mu\text{s}$ .



**Abb. 3.6:** Experimentelle  $^{13}\text{C}$ -Signale als Funktion der Mischzeit, beobachtet für  $t_1=0$ , generiert mittels longitudinalem Magnetisierungsübertrag unter Verwendung des angegebenen adiabatischen Pulses ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit, bei einer Drehfrequenz von 11,111 kHz. Falls nicht anders angegeben, wurden Pulse mit  $t_p=90\ \mu\text{s}$  verwendet. Alle anderen Parameter wie in Abb. 3.5b.



**Abb. 3.7:** Experimentelle  $^{13}\text{C}$ -Signale als Funktion der Mischzeit, beobachtet für  $t_1=0$ , generiert mittels TOBSY unter Verwendung des angegebenen adiabatischen Pulses ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit, bei einer Drehfrequenz von 23,810 kHz. Alle anderen Parameter wie in Abb. 3.5d.

salen Mischsequenzen ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung von Vorteil ist. Dieser Unterschied der beobachteten Leistungscharakteristika steht im Zusammenhang mit den Magnetisierungstrajektorien während der Mischzeit. Klar erkennbar ist dies an der zeitlichen Entwicklung der transversalen Magnetisierung bei Einstrahlung des cagauss-Inversionspulses (Abb. 3.2c). Während die HF-Feldstärke minimal ist, ist die Magnetisierung hauptsächlich transversal. Solch eine Situation kann zu einem schnellen Relaxieren der transversalen Magnetisierungskomponenten und damit zu reduzierten Signalintensitäten führen. Für longitudinale Magnetisierungsübertragung ist dies nicht der Fall, da sich hier die Magnetisierung so entwickelt, dass diese für einen Großteil der Pulsdauer parallel zur z-Achse bleibt. Deshalb kann mit Mischsequenzen basierend auf adiabatischen Pulsen wie cagauss für longitudinalen Magnetisierungsaustausch eine zufriedenstellende Leistung erwartet werden. Dagegen können Mischsequenzen basierend auf tanh/tan-Pulsen effektiv in longitudinalen sowie transversalen Mischsequenzen eingesetzt werden.

Obwohl der Magnetisierungsübertrag mit TOBSY-Sequenzen unter Verwendung adiabatischer Pulse keineswegs ideal ist, ist auch in den spektralen Querschnitten in Abb. 3.5d die bessere Wirksamkeit von adiabatischen Pulsen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor ersichtlich. Noch deutlicher ist dies längeren Mischzeiten (Abb. 3.7) erkennbar. Nichtsdestotrotz ist eine Verbesserung der Effektivität von TOBSY-Sequenzen nötig, worauf in den nächsten Kapiteln eingegangen wird.

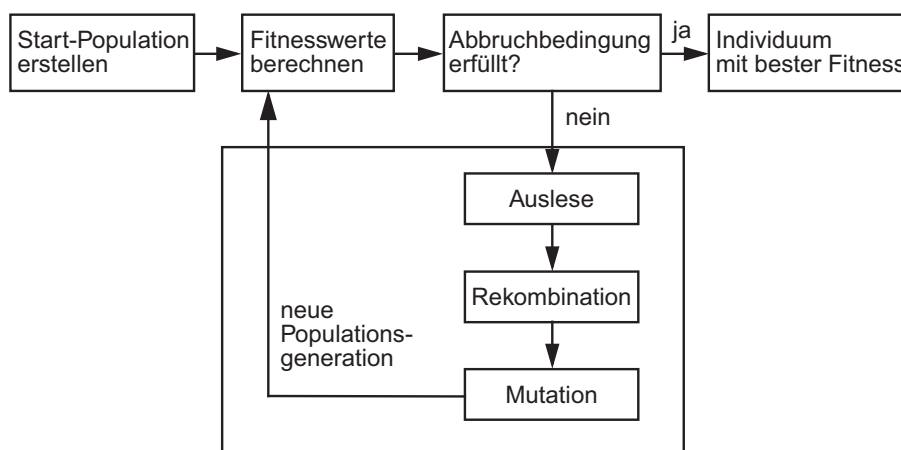
Die Vor- und Nachteile der Verwendung von Inversionspulsen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor in  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimenten ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit wurden in diesem Kapitel untersucht. Dabei zeigte sich, dass es nicht nur praktikabel, sondern auch vorteilhaft ist, Pulssequenzen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor bei longitudinalem Magnetisierungsaustausch ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung zu verwenden. Hingegen sind Sequenzen basierend auf adiabatischen tanh/tan-Pulsen effektiver für transversale Mischsequenzen ohne heteronukleare Entkopplung. Die zeitliche Entwicklung der relevanten Magnetisierungskomponente hat einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtleistung der Mischsequenz ohne Einstrahlung von  $^1\text{H}$ -Entkopplung.

## Kapitel 4

# Konstruktion von $180^\circ$ -Pulsen und Mischsequenzen für Korrelationen der chemischen Verschiebung

### 4.1 Einleitung

Wie schon im vorhergehenden Kapitel beschrieben, kann es von Vorteil sein, Korrelationsexperimente der chemischen Verschiebung ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung durchzuführen. Solche Sequenzen können durch Verwendung einfacher  $180^\circ$ -Rechteckpulse [6], zusammengesetzter Rechteckpulse [43; 74] sowie adiabatischer Inversionspulse (siehe Kap. 3) realisiert werden. Zum Beispiel ist es möglich, skalare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit unter Verwendung des symmetriebasierten HF-Pulsschemas  $\text{R}30_6^{14}$  mit dem Basiselement  $\{(90)_x(270)_{-x}\}$  und einer HF-Feldstärke gleich dem 5-fachen der Drehfrequenz zu erzeugen [74]. Die Schreibweise  $\{(90)_x(270)_{-x}\}$  symbolisiert ein aus zwei Rechteckpulsen bestehendes Element, wobei der erste HF-Puls ein  $90^\circ$ -Puls mit  $x$ -Phase und der zweite Puls ein  $270^\circ$ -Puls mit  $-x$ -Phase ist. Solche Abhängigkeiten der HF-Feldstärke von der Drehgeschwindigkeit können die Anwendbarkeit dieser Sequenzen bei sehr hohen MAS-Frequenzen begrenzen. Auch bei Verwendung adiabatischer Inversionspulse können die HF-Feldstärkeanforderungen außerhalb der Grenzen des Spektrometers liegen, wenn Inversionspulse von kurzer Länge benötigt werden. Weiterhin ist es möglich, dass HF-Pulssequenzen, welche auf adiabatischen Pulsen basieren, nicht notwendigerweise zu zufriedenstellenden Resultaten führen (siehe Kap. 3, TOBSY-Resultate). In solchen Fällen muss das Modulationsprofil des HF-Pulses an die experimentellen Gegebenheiten angepasst werden. Dafür ist eine komfortable Methode vonnöten, welche die erlaubte



**Abb. 4.1:** Schema des Genetische Algorithmen Optimierungsverfahrens

HF-Feldstärke in Betracht zieht, und das Erstellen von Breitband-Inversions- und Universalrotationspulsen sowie von Mischsequenzen basierend auf solchen Pulsen erlaubt. In diesem Kapitel wird gezeigt, dass es möglich ist, maßgeschneiderte  $180^\circ$ -Pulse und Mischsequenzen für  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimente der chemischen Verschiebung zu konstruieren. Dafür wird das Modulationsprofil des  $180^\circ$ -Pulses durch eine Teilsumme einer Fourierreihe dargestellt und die entsprechenden Fourierkoeffizienten optimiert. Diese Darstellung lieferte bereits in Flüssigkeits-NMR-Studien [51; 52] gute Ergebnisse.

#### 4.1.1 Genetische Algorithmen

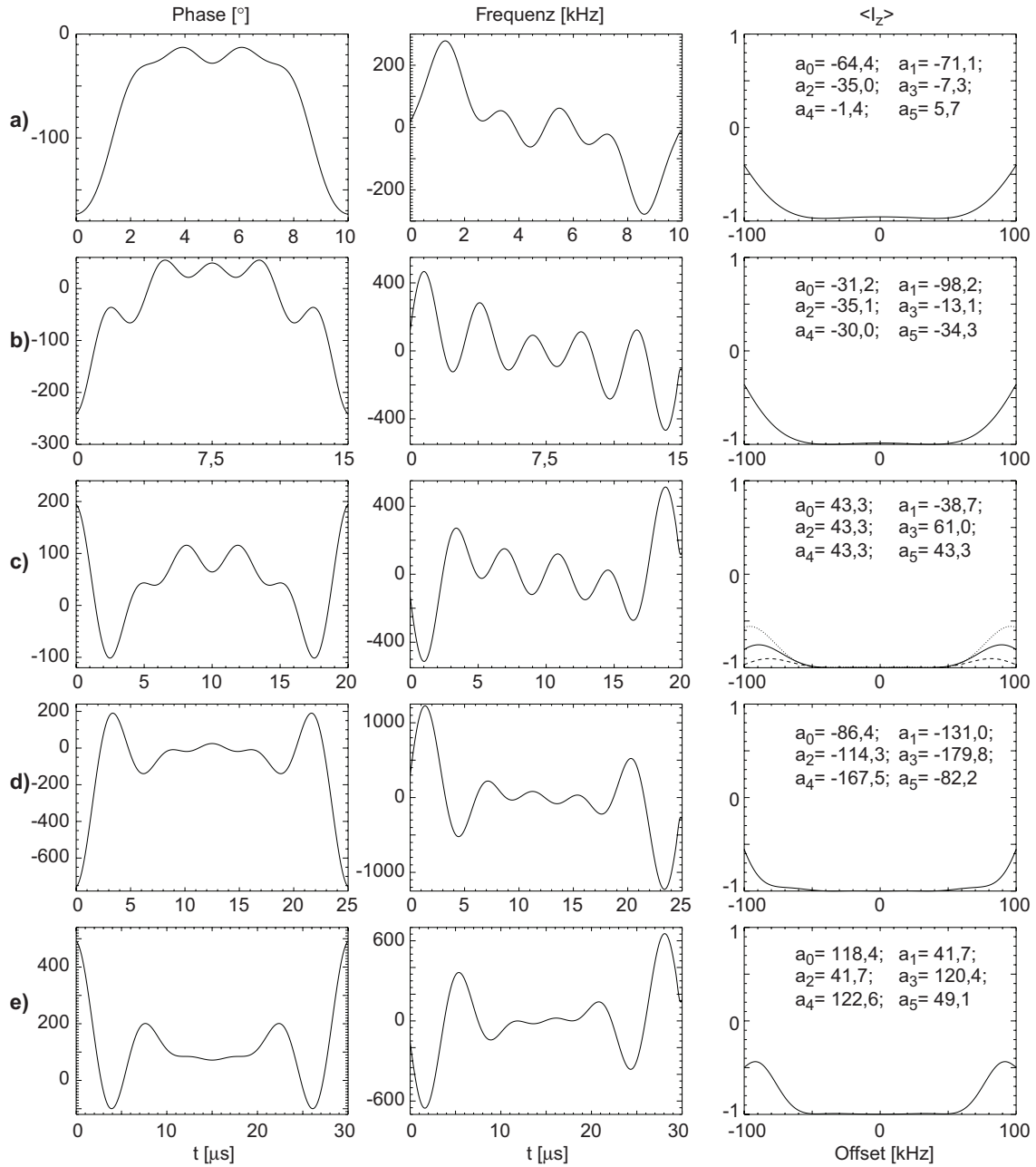
Genetische Algorithmen (GA) sind heuristische Optimierungsverfahren und gehören zu den Evolutionären Algorithmen. Inspiriert von der biologischen Evolution, basieren diese darauf, eine Menge (Population) von Lösungskandidaten (Individuen) zu erzeugen, und die besten Kandidaten entsprechend bestimmter Kriterien auszuwählen (Auslese) (Abb. 4.1). Dabei wird den Kandidaten ein Zahlenwert (Fitnesswert) zugeordnet, welcher angibt, wie gut dieser Kandidat das Problem löst. Durch Mutation und Rekombination der Eigenschaften wird dann eine neue Population (eine neue Generation) erzeugt. Diese Vorgehensweise wird mehrmals wiederholt, bis ein Abbruchkriterium erreicht wird. GA wurden bereits zur Konstruktion von HF-Pulsen für die NMR-Spektroskopie verwendet [25; 26; 111; 112]. In dieser Arbeit wurde die GASimpleGA-Routine aus dem GALib-Programmpaket von Matthew Wall [108] zur Optimierung der HF-Phasenmodulationsprofile genutzt. Jeder Lösungskandidat wurde als eindimensionales Real-Array repräsentiert. Als Fortpflanzungsoperator zur Auswahl der besten Individuen wurde die Rouletterad-Selektion verwendet [28; 36; 46]. Hierbei ist die Auswahlwahrscheinlichkeit proportional zum Fitnesswert des Kandidaten. Der Übergang zur nächsten Generati-

on wird durch die Operatoren *Single-Point Crossover* und *Swap Mutator* erreicht. Dabei werden zwei Individuen (Eltern) ausgewählt, in jeweils zwei Teile geteilt und kreuzweise wieder zusammengesetzt (Rekombination). Weiterhin wird ein Element des Arrays bestimmt und durch einen zufälligen Wert ausgetauscht (Mutation).

## 4.2 Numerische und experimentelle Methoden

Diese Studie beschränkt sich auf Mischsequenzen mit phasenmodulierten  $180^\circ$ -Pulsen mit konstanter Amplitude. Das phasenmodulierte Profil wurde dabei durch eine Teilsumme einer Kosinus-Fourierreihe dargestellt:  $\phi(t) = \sum_{k=0}^n a_k \cos(k\omega t)$ , wobei  $\omega = 2\pi/t_p$  die Modulationsfrequenz und  $t_p$  die Pulslänge beschreiben. Zur Generierung von breitbandigen  $180^\circ$ -Pulsen wurden HF-Feldstärken von 100-120 kHz, Pulsbreiten im Bereich von 10-30  $\mu s$ , eine geringe  $B_1$ -Feldinhomogenität ( $< \pm 10\%$ ), 6 Fourierkoeffizienten und ein Spin- $\frac{1}{2}$ -System berücksichtigt. Typische Parameter der GA-Optimierung waren 250-500 Generationen und Populationsgrößen im Bereich von 1000-10000. Ideale Inversionspulse sollten das Spinsystem vom Anfangszustand  $\langle I_z \rangle$  in den  $-\langle I_z \rangle$ -Zustand überführen, sowie ideale Universalrotationspulse einen Propagator  $U = \exp(i\pi I_x)$  erzeugen. Die mittels GA optimierten Pulse wurden in Mischsequenzen zur Rückkopplung dipolarer bzw. skalarer Kopplungen verwendet. Die Effizienz dieser Sequenzen und der generierten Pulse wurde anhand von Korrelationsexperimenten der chemischen Verschiebung bewertet. Falls die Effizienz in den numerischen Simulationen nicht ausreichend war, wurde danach ein weiterer Optimierungsschritt durchgeführt (siehe unten). Dipolare Korrelationsspektren ohne  $^1H$ -Entkopplung während der Mischzeit wurden mit der dipolaren Rückkopplungssequenz RFDR und einer Drehfrequenz von 34 kHz erzeugt. Die durch skalare Kopplungen vermittelten Experimente wurden mittels symmetriebasierten  $CN_n^V$ -Pulssequenzen und einer Drehfrequenz von 33,3 kHz durchgeführt. Alle Spektren wurden mit einer  $\{^{13}C, ^{15}N\}$ -markierten Probe von L-Histidin generiert. Die Luftkühlung wurde bei einer Temperatur von  $\sim -50^\circ C$  gehalten, was einer Proben temperatur von ca.  $0^\circ C$  bei einer Drehfrequenz von 33,333 kHz entspricht. Alle Multispin-Simulationen und Optimierungen wurden unter Benutzung der Parameter für chemische Verschiebungen und skalare und dipolare Kopplungen aus Abb. 3.3 mittels der SPINEVOLUTION-Software [107] durchgeführt, welche auch in den folgenden Kapiteln eingesetzt wurde.

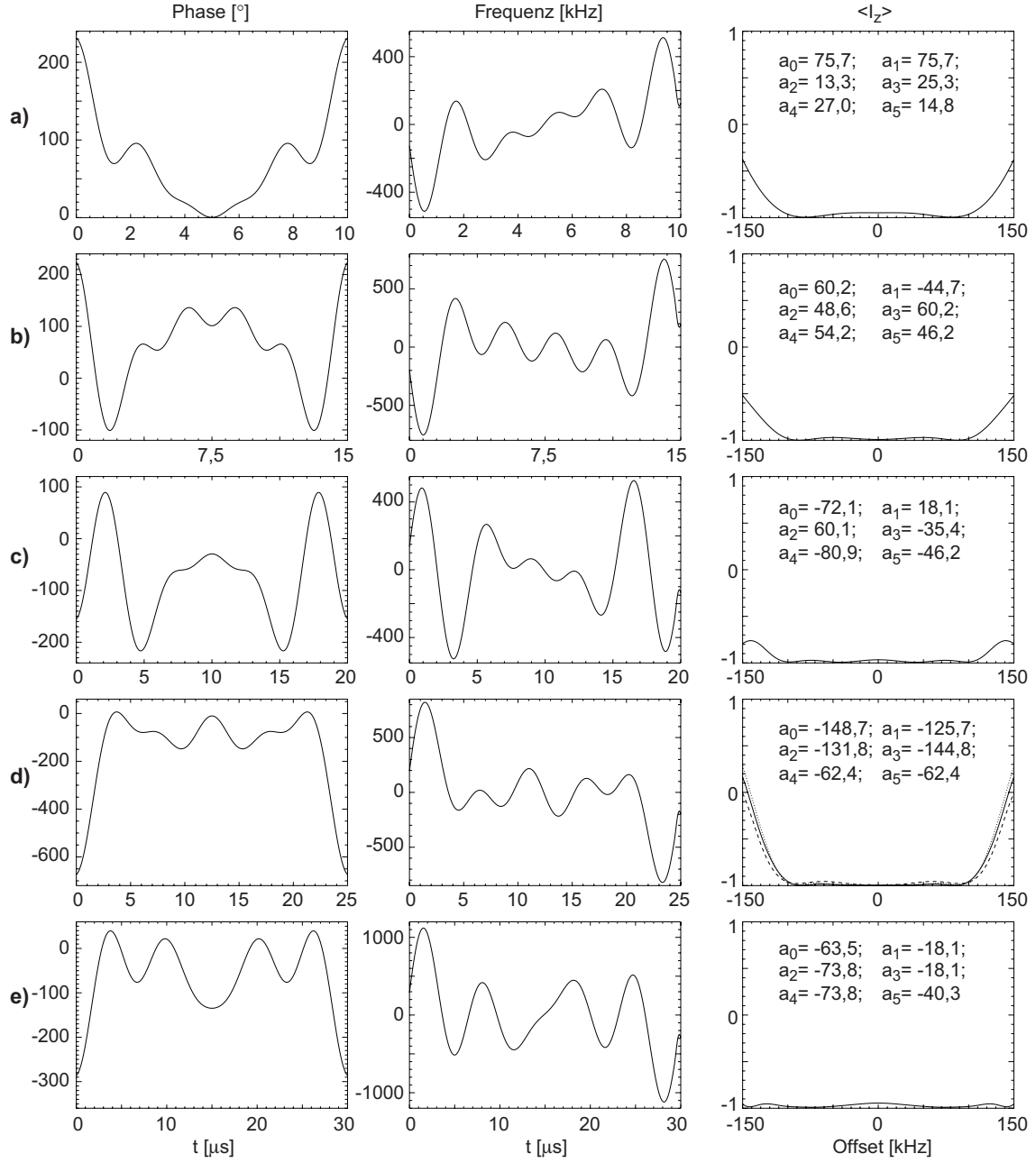




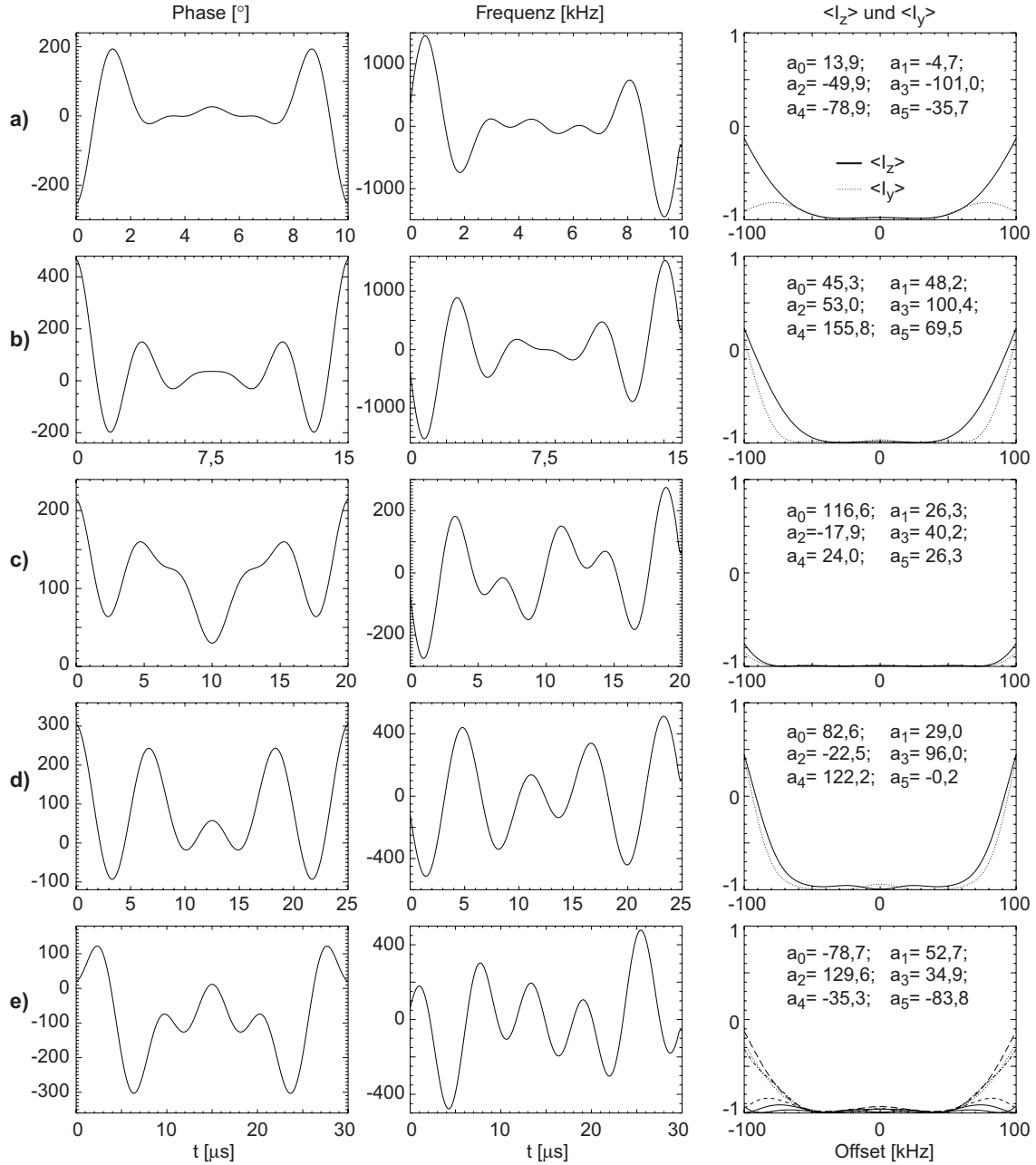
**Abb. 4.2:** Phasen- und Frequenzmodulationsprofile optimierter Inversionspulse, unter Berücksichtigung von HF-Feldstärken von 100 kHz und Inversionsbandbreiten von 100 kHz. Die Inversionsprofile sowie die entsprechenden Fourierkoeffizienten sind angegeben. Repräsentativ ist das Inversionsprofil eines 180°-Pulses von 20  $\mu$ s Länge bei Variation der HF-Feldstärke um  $\pm 10$  % dargestellt.

### 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Das Phasen-, Frequenz- und simulierten Inversionsprofile sowie die dazugehörigen Fourierkoeffizienten  $a_n$  von repräsentativen optimierten 180°-Breitbandpulsen mit Pulslängen im Bereich von 10-30  $\mu$ s sind in Abb. 4.2-4.4 gezeigt. Die in Abb. 4.2 und Abb. 4.3 dargestellten 180°-Pulse wurden unter Forderung einer Bandbreite von 100 bzw. 200 kHz für HF-Feldstärken von 100 bzw. 120 kHz konstruiert. Die für eine HF-Feldstärke von 120 kHz unter Forderung einer Bandbreite von 100 kHz optimierten Universalro-



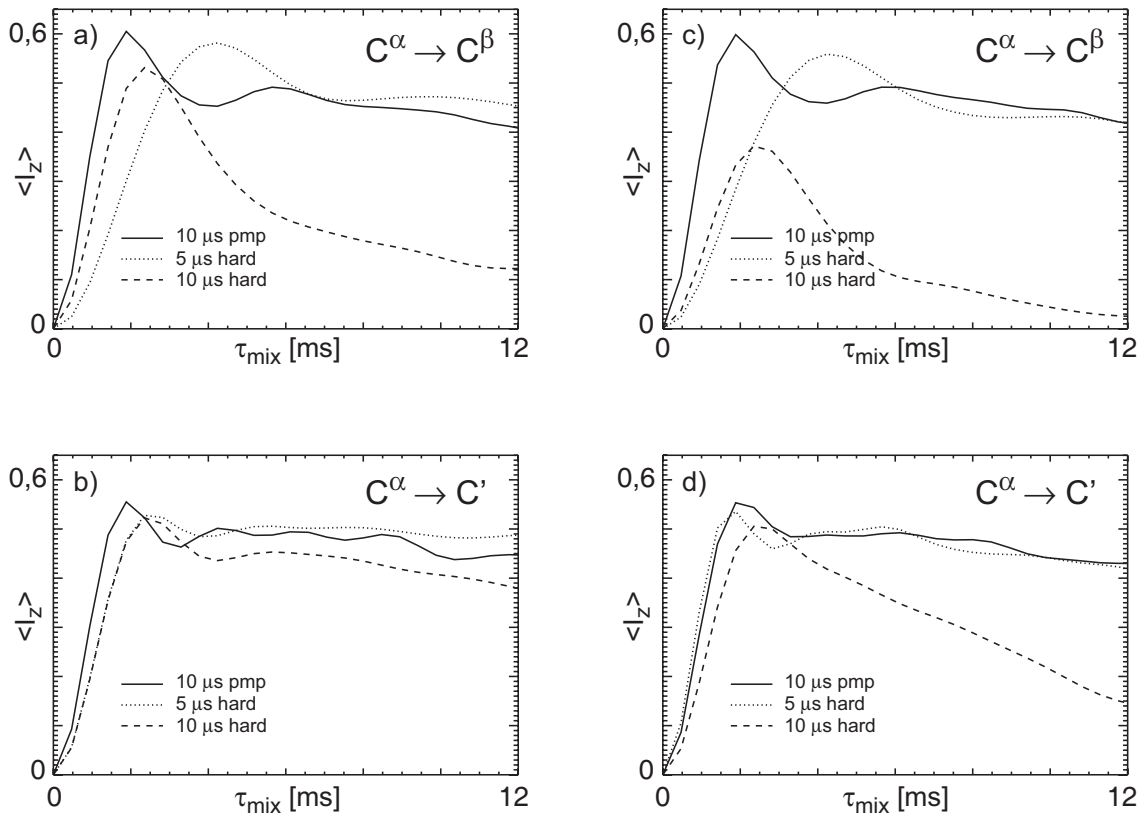
**Abb. 4.3:** Phasen- und Frequenzmodulationsprofile optimierter Inversionspulse, unter Berücksichtigung von HF-Feldstärken von 120 kHz und Inversionsbandbreiten von 200 kHz. Die Inversionsprofile sowie die entsprechenden Fourierkoeffizienten sind angegeben. Repräsentativ ist das Inversionsprofil eines 180°-Pulses von 25 μs Länge bei Variation der HF-Feldstärke um ±10 % dargestellt.



**Abb. 4.4:** Phasen- und Frequenzmodulationsprofile optimierter Universalrotationspulse, unter Berücksichtigung von HF-Feldstärken von 120 kHz und Inversionsbandbreiten von 100 kHz. Die Charakteristika der longitudinalen ( $\langle I_z \rangle$ ) und transversalen ( $\langle I_y \rangle$ ) Magnetisierungsinversion sowie die entsprechenden Fourierkoeffizienten sind angegeben. Repräsentativ sind die Inversionsprofile eines 180°-Pulses von 30 μs Länge bei Variation der HF-Feldstärke um  $\pm 10$  % dargestellt.

tationspulse sind in Abb. 4.4 zu sehen. Generell wird die Leistung der  $180^\circ$ -Pulse nicht signifikant durch geringe Variationen der HF-Feldstärke, zum Beispiel aufgrund von HF-Feldinhomogenitäten, beeinflusst. Die phasenmodulierten Pulse wurden in 100 Intervalle gleicher Länge eingeteilt. Dies führte zu einer Rechendauer der Optimierung von wenigen Stunden (Mac Pro: 4-6 h). Obwohl die Pulse für eine spezifische Dauer konstruiert wurden, sind diese wie konventionelle Pulse skalierbar. Verlängert man den Puls um das Doppelte, so benötigt dieser nur die halbe HF-Feldstärke und besitzt ebenso nur die halbe Bandbreite. Die Mindest-HF-Feldstärke, welche nötig ist, um die gewünschte Inversionsbandbreite zu erreichen, variiert erwartungsgemäß abhängig von der Pulsdauer und wurde in dieser Studie nicht untersucht. Trotzdem kann man anhand der Inversionsprofile in Abb. 4.2-4.4 sehen, dass effiziente  $180^\circ$ -Breitbandpulse mit HF-Feldstärken im Bereich von 100-120 kHz generiert werden können. Solche HF-Feldstärken sind typischerweise in Festkörper-NMR-Probenköpfen, welche für schnelle Drehgeschwindigkeiten geeignet sind, nutzbar.

Die phasenmodulierten Inversions- und Universalrotationspulse wurden in verschiedenen Mischsequenzen verwendet und deren Wirksamkeit numerisch, unter Betrachtung eines  $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1\text{-}^{13}\text{C}2\text{-}^1\text{H}2$ - oder  $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1\text{-}^{13}\text{C}2$ -Spinsystems, bewertet. Beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffspins wurde die Größe der zum zweiten Kohlenstoffspin übertragenen longitudinalen Magnetisierung in Abhängigkeit von der Mischzeit untersucht. Dabei ist der anfängliche Anstieg der übertragenen Magnetisierung ein Maß für die Effektivität der Sequenz. Manche der phasenmodulierten  $180^\circ$ -Pulse führten auch ohne weitere Optimierung der Fourierkoeffizienten zu zufriedenstellender Leistung. In Abb. 4.5 ist die RFDR-Leistung für eine Drehfrequenz von 34 kHz dargestellt. Phasenmodulierte Inversionspulse mit Pulslängen von  $10\ \mu\text{s}$  wurden unter Verwendung des  $xy\text{-}16$ -Phasenschemas [31] rotorsynchron in der Mitte der Rotationsperiode eingestrahlt. Die Simulationen wurden für zwei verschiedene Zeeman-Feldstärken, entsprechend  $^1\text{H}$ -Frequenzen von 500 bzw. 750 MHz, durchgeführt. Zum Vergleich sind auch die simulierten Leistungen von 5 bzw.  $10\ \mu\text{s}$   $180^\circ$ -Rechteckpulsen abgebildet. Man sieht anhand des schnelleren und höheren Magnetisierungsübertrags, dass RFDR mit phasenmodulierten Pulsen im Allgemeinen zu besserer Gesamtleistung führt, insbesondere bei 750 MHz. Die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung sind auch für Kohlenstoffkerne mit großen CSA-Werten und geringen Unterschieden der isotropen chemischen Verschiebungen der zwei Kerne besser. Dies ist typischerweise der Fall bei Kohlenstoffen in aromatischen Ringen (Daten nicht gezeigt).

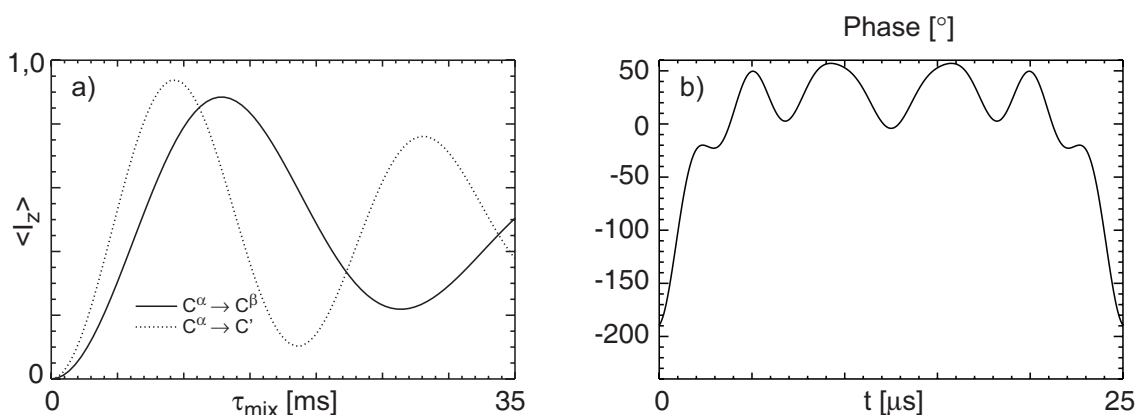


**Abb. 4.5:** Simulierte Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung unter Verwendung der RFDR-Sequenz mit einem phasenmodulierten Inversionspuls von 10  $\mu\text{s}$  Länge (pmp), ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit, xy-16 Phasenzyklus und einer Drehfrequenz von 34 kHz. Zum Vergleich ist die Leistung mittels 5  $\mu\text{s}$  und 10  $\mu\text{s}$  Rechteckinversionspulsen angegeben (5  $\mu\text{s}$  bzw. 10  $\mu\text{s}$  hard). Die Fourierkoeffizienten des phasenmodulierten 10  $\mu\text{s}$  Pulses, generiert für eine Inversionsbandbreite von 60 kHz und eine HF-Feldstärke von 120 kHz, sind:  $a_0=-56,7$ ;  $a_1=66,7$ ;  $a_2=27,8$ ;  $a_3=23,5$ ;  $a_4=-5,5$ ;  $a_5=-14,1$ . Die Grafiken zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung (normiert in Bezug auf das maximal übertragbare Signal) auf den zweiten Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}^\beta/^{13}\text{C}'$ ), beginnend mit z-Magnetisierung auf Kohlenstoff 1 ( $^{13}\text{C}^\alpha$ ) bei Zeeman-Feldstärken entsprechend  $^1\text{H}$ -Frequenzen von (a,b) 500 MHz und (c,d) 750 MHz. Andere Parameter analog zu Abb. 3.3.

Eine anfängliche Einschätzung der TOBSY-Leistung von symmetriebasierten  $\text{CN}_n^V$ -Pulssequenzen unter Benutzung von phasenmodulierten  $180^\circ$ -Pulsen wurde mittels numerischer Simulationen durchgeführt. Die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung in einem  $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1\text{-}^{13}\text{C}2\text{-}^1\text{H}2$ -Spinsystem unter Einbeziehung der heteronuklearen dipolaren Kopplungen war dabei nicht annähernd zufriedenstellend. Aufgrunddessen wurde ein weiterer Optimierungsschritt durchgeführt. Die auf der nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate aufbauende lokale Optimierungsprozedur NL2SOL, welche im SPINEVOLUTION-Programm integriert ist, wurde angewandt, um eine vollständige Magnetisierungsübertragung bei einer Mischzeit von  $\tau_{mix} = (1/2J_{CC})$  (siehe Kap. 3.1.3) von einem Kohlenstoff zum anderen zu erreichen. Folgende Parameter wurden für die Optimierung verwendet: Phasenmodulierte  $180^\circ$ -Pulse von 25  $\mu\text{s}$  Länge, C-Basiselemente des Typs  $\{x\bar{x}\}$ , eine repräsentative Drehfrequenz von 33,333 kHz, eine Zeeman-Feldstärke

entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 500 MHz, Parameter der skalaren und dipolaren Kopplungen sowie der Tensoren der chemischen Verschiebung von Alanin (siehe Abb. 3.3) sowie 9 Fourierkoeffizienten. Dabei entspricht  $\{x\bar{x}\}$  der zweifachen Einstrahlung des  $180^\circ$ -Pulses, wobei beim zweiten Einstrahlen das Phasenprofil um  $180^\circ$  verschoben wird. Um breitbandige Magnetisierungsübertragung zu erreichen, wurde die Optimierung über einen Resonanzoffsetbereich von  $\pm 15$  kHz für die zwei Kohlenstoffe durchgeführt. Als Startwerte der lokalen Optimierung wurden die Fourierkoeffizienten von Inversions- bzw. Universalrotationspulsen, welche zu zufriedenstellender TOBSY-Leistung in einem  $^{13}\text{C}1$ - $^{13}\text{C}2$ -Spinsystem führten, verwendet. Eine einstufige Optimierung unter Betrachtung der vollen dipolaren  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Kopplungsstärke (20 kHz, entspricht einem typischen  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Abstand einer Einfachbindung von rund 1.14 Å) hat sich als wenig effektiv herausgestellt, um gute Mischsequenzen zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die dipolare  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Kopplungsstärke in mehreren Schritten erhöht. In jedem Schritt wurde die lokale Optimierung mehrmals unter zufälliger Variation der Fourierkoeffizienten über einen Bereich von  $\pm 10\%$  gestartet. Die besten Fourierkoeffizienten am Ende jeden Schrittes wurden dann als Startwerte für den folgenden Schritt verwendet. Die Kalkulationen wurden unter Vernachlässigung von HF-Feldinhomogenitäten und unter Verwendung von 32 Kristallorientierungen, ausgewählt nach dem Zaremba-Chen-Wolfsberg-Schema (ZCW) [20], durchgeführt. Die typische Dauer eines Optimierungslaufes war 9-12 h. Eine Erhöhung der Anzahl der Kristallorientierungen im Optimierungsprozess führte zu keinen signifikanten Verbesserungen (Daten nicht gezeigt).

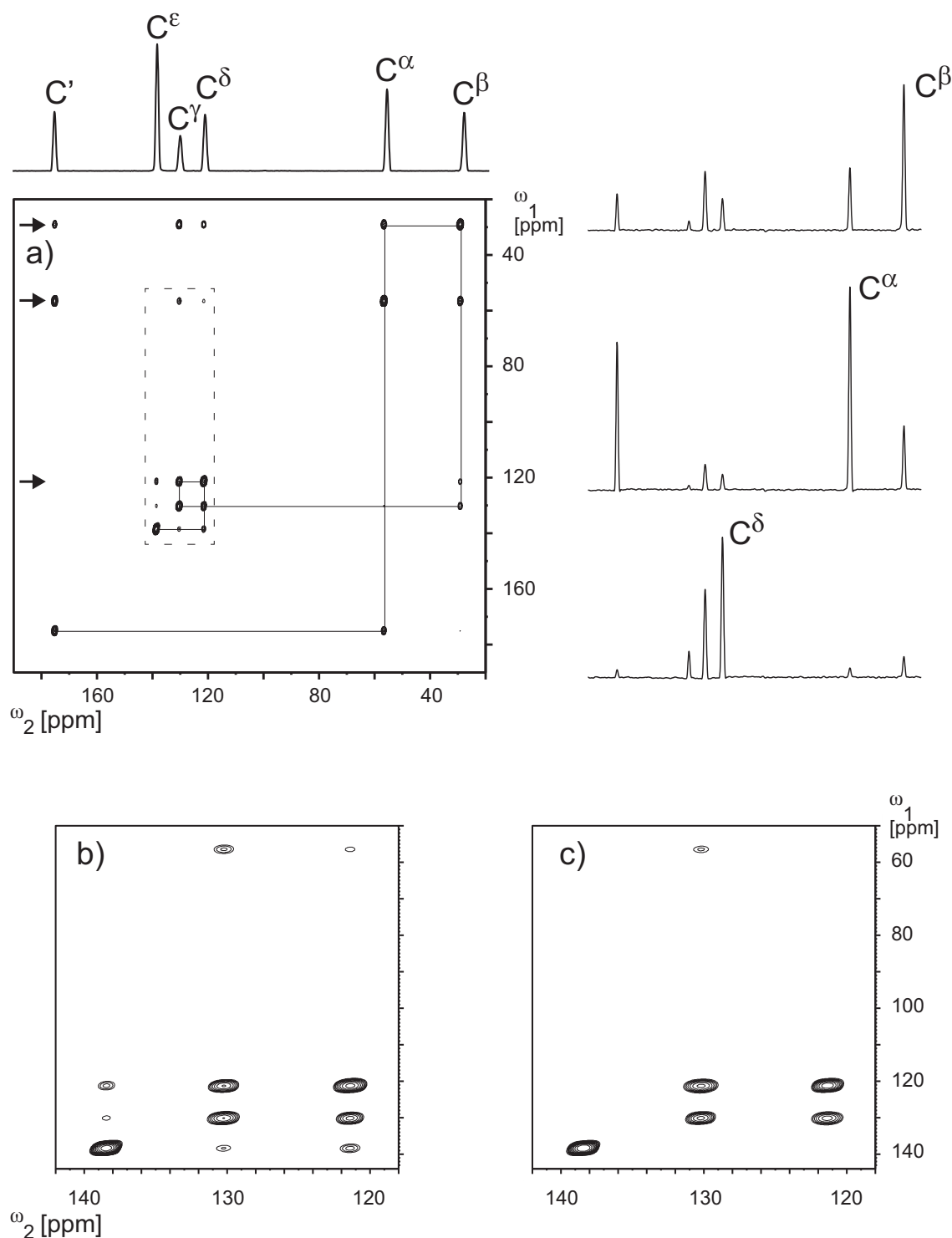
Abb. 4.6 zeigt die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung einer der besten TOBSY-Mischsequenzen, welche in dieser Studie generiert wurden. Zusätzlich ist das Phasenmodulationsprofil des verwendeten  $180^\circ$ -Pulses abgebildet. Ein 25  $\mu\text{s}$ -Universalrotationspuls, welcher für eine Inversionsbandbreite von 260 kHz und eine HF-Feldstärke von 120 kHz konstruiert wurde, wurde dabei als Startwert für die lokale Optimierung verwendet. Die Magnetisierungsübertragungskurven machen die Effizienz der Optimierungsprozedur deutlich, da fast der Idealwert einer vollständigen Polarisationsübertragung erreicht wird. Obwohl es möglich war, mehrere TOBSY-Mischsequenzen mit zufriedenstellender Leistung zu generieren, wurde keine umfangreiche Suche nach der bestmöglichen Sequenz sowie nach der geringsten notwendigen HF-Feldstärke durchgeführt. Dies würde eine detaillierte Bewertung einer Vielzahl von symmetriebasierten Sequenzen mit verschiedenen Basiselementen beinhalten und könnte das Ziel zukünftiger Arbeiten sein.



**Abb. 4.6:** (a) Simulierte Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung unter Verwendung der symmetriebasierten  $C9_{15}^1$ -Pulssequenz mit einem C-Basiselement des Typs  $\{x\bar{x}\}$  und einem  $180^\circ$ -Puls von  $25 \mu\text{s}$  Länge, dessen Phasenmodulationsprofil in (b) gezeigt ist. Die Fourierkoeffizienten des optimierten phasenmodulierten Pulses sind:  $a_0=0,0$ ;  $a_1=-56,9$ ;  $a_2=-43,6$ ;  $a_3=-21,2$ ;  $a_4=-29,3$ ;  $a_5=2,6$ ;  $a_6=-12,5$ ;  $a_7=-18,0$ ;  $a_8=-12,2$ . Die Graphen in (a) zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung (normiert in Bezug auf das maximal übertragbare Signal) auf den zweiten Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}^\beta/^{13}\text{C}'$ ) beginnend mit z-Magnetisierung auf Kohlenstoff 1 ( $^{13}\text{C}^\alpha$ ). Die Simulationen wurden für eine Drehfrequenz von  $33,333 \text{ kHz}$ , eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von  $500 \text{ MHz}$ , ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung und mit einer HF-Feldstärke von  $120 \text{ kHz}$  durchgeführt. Andere Parameter analog zu Abb. 3.3.

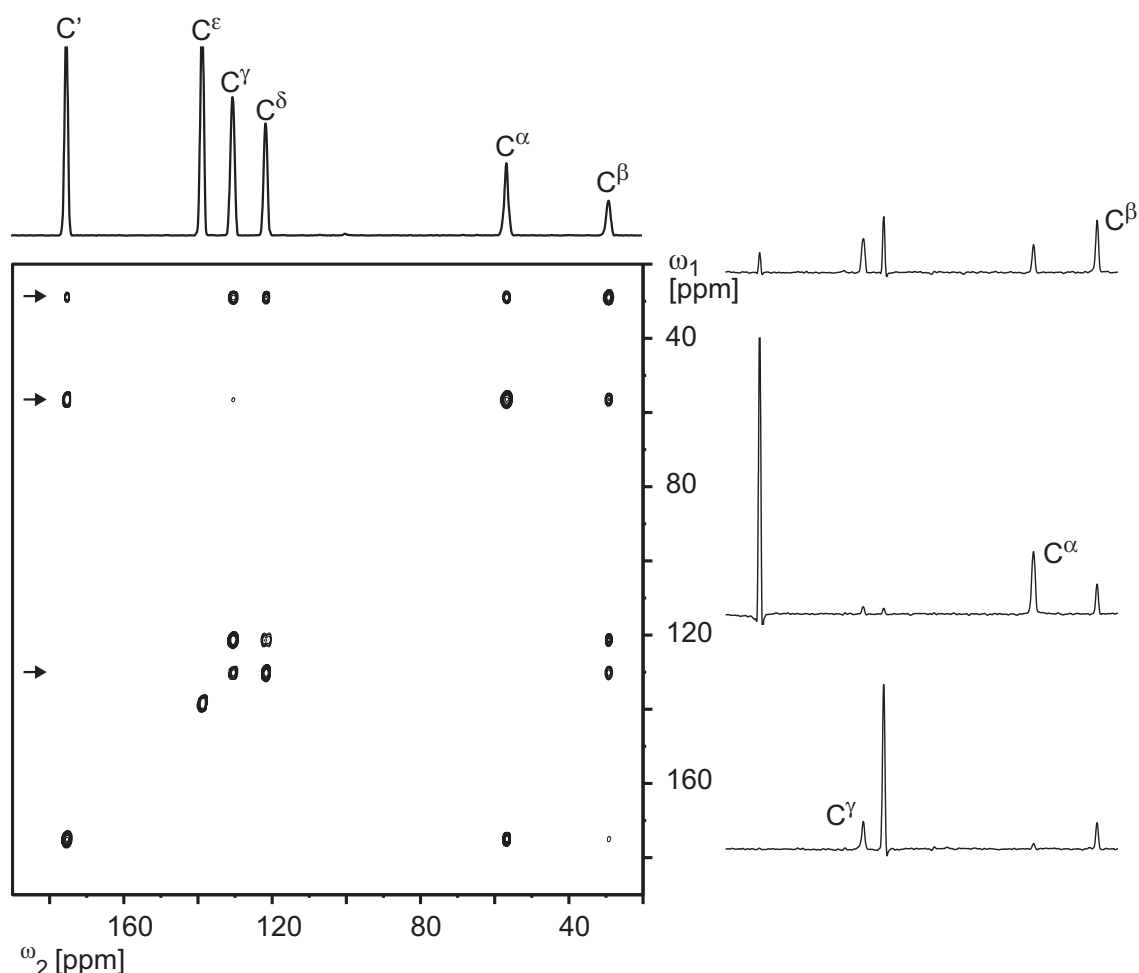
Zusätzlich zu den numerischen Simulationen wurden die Leistungscharakteristika der phasenmodulierten Mischsequenzen auch via experimentelle Messungen überprüft. Abb. 4.7 zeigt das dipolare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum von L-Histidin, aufgenommen mit der RFDR-Sequenz unter Verwendung von phasenmodulierten Inversionspulsen von  $10 \mu\text{s}$  Länge ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. Zum Vergleich wurde das dipolare Korrelationsexperiment auch mit  $5 \mu\text{s}$   $180^\circ$ -Rechteckpulsen durchgeführt. Ein Ausschnitt aus diesen Spektren ist in Abb. 4.7b,c zu sehen. Übereinstimmend mit den numerischen Simulationen zeigt das Spektrum, welches mit dem phasenmodulierten Inversionspuls generiert wurde, höhere Signalintensitäten. Die Verwendung von HF-Pulsen mit einer Pulsdauer, welche deutlich kleiner ist als die Rotationsperiode, hat weitere Vorteile für RFDR-Experimente. So kann das Aufheizen der Probe vermieden sowie Relaxationsverluste verringert werden, da sich die Magnetisierung die meiste Zeit parallel zur z-Achse befindet (siehe Kap. 3). Die hier gezeigten Resultate zeigen deutlich, dass kurze phasenmodulierte  $180^\circ$ -Pulse genutzt werden können, um durch dipolare Kopplungen vermittelte  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung bei hohen Drehfrequenzen zu realisieren.

Das TOBSY-Spektrum in Abb. 4.8 wurde mit der symmetriebasierten HF-Pulssequenz  $C9_{15}^1$  und einer Mischzeit von  $5,4 \text{ ms}$  generiert. Trotz der geringen verwendeten Mischzeit spiegelt sich die schnelle Magnetisierungsübertragung aufgrund der starken skalaren  $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}'$ - und  $^{13}\text{C}^\gamma$ - $^{13}\text{C}^\delta$ -Kopplungen in den entsprechend großen Kreuzsignal-



**Abb. 4.7:** (a) 2D- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum der chemischen Verschiebung unter Verwendung der RFDR-Sequenz mit einem  $10\mu\text{s}$  phasenmoduliertem Inversionspuls (optimiert für eine Inversionsbandbreite von 60 kHz und eine HF-Feldstärke von 120 kHz), ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von 34 kHz, eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärke von 120 kHz, 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 128  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 34000 Hz, Regenerierungszeit von 2 s, das xy-16-Phasenschema, eine Mischzeit von 2,82 ms und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 110 ppm. Weiterhin sind repräsentative spektrale Querschnitte an den gekennzeichneten Stellen gegeben. Eine vergrößerte Darstellung des in (a) angedeuteten spektralen Bereichs ist in (b) zu sehen, zusammen mit (c) der entsprechenden Region aus dem mit 5  $\mu\text{s}$  Rechteckinversionspulsen generierten Spektrum.





**Abb. 4.8:** 2D-TOBSY- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum der chemischen Verschiebung unter Verwendung der symmetriebasierten  $\text{C9}_{15}^1\text{HF}$ -Pulssequenz mit einem C-Basiselement des Typs  $\{xx\}$  und einem  $180^\circ$ -Puls von  $25\ \mu\text{s}$  Länge, dessen Phasenmodulationsprofil in 4.6b gezeigt ist. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von  $33,333\ \text{kHz}$ , keine  $^1\text{H}$ -Entkopplung und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärke von  $120\ \text{kHz}$  während der Mischzeit, 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 128  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von  $33333\ \text{Hz}$ , Regenerierungszeit von  $2\ \text{s}$ , eine Mischzeit von  $2,82\ \text{ms}$  und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von  $110\ \text{ppm}$ . Weiterhin sind repräsentative spektrale Querschnitte an den gekennzeichneten Stellen gegeben.

intensitäten wider. Wie zu erwarten ist das Spektrum auch im Wesentlichen frei von Kreuzsignalen mit dem  $^{13}\text{C}^\epsilon$ -Kohlenstoff, da dieses an keine Kohlenstoffe direkt gebunden ist. Übereinstimmend mit den Resultaten aus den numerischen Simulationen sieht man, dass phasenmodulierte Mischsequenzen auch effektiv angewandt werden können, um TOBSY-Spektren bei hohen MAS-Frequenzen zu generieren.

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass breitbandige, phasenmodulierte Inversions- und Universalrotationspulse mittels globaler Optimierungsprozeduren wie Genetic Algorithms unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden HF-Feldstärke konstruiert werden können. Obwohl nur ein begrenzter Bereich von möglichen Pulsformen aufgrund der Restriktion des HF-Modulationsprofils auf Fourierrei-

hendarstellung untersucht wurde, ist diese Herangehensweise gut genug, um effektive  $180^\circ$ -Pulse und Mischsequenzen zu erstellen. Es ist nicht *a priori* bekannt, welche Inversionsbandbreite für eine gegebene HF-Feldstärke und Pulsdauer erreichbar ist. Deswegen ist es notwendig, mehrere Optimierungsläufe mit verschiedenen Inversionsbandbreiten durchzuführen, um die maximale Bandbreite, bei der eine zufriedenstellende Inversionsleistung erreicht werden kann, zu finden. Die Resultate zeigen, dass bei Verwendung von HF-Feldstärken im Bereich von 100-120 kHz effiziente phasenmodulierte  $180^\circ$ -Pulse mit Inversionsbandbreiten  $>100$  kHz generiert werden können. In den Vorarbeiten zu dieser Studie wurde festgestellt, dass auch andere globale Optimierungsmethoden, zum Beispiel *Simulated Annealing* [50; 72], zur Konstruktion von phasenmodulierten  $180^\circ$ -Pulsen verwendet werden können. Weiterhin wurde gezeigt, dass die konstruierten Pulse effektiv in Mischsequenzen, welche dipolare Wechselwirkungen rückkoppeln, bei hohen MAS-Frequenzen eingesetzt werden können. Falls die Leistung von Mischsequenzen basierend auf optimierten  $180^\circ$ -Pulsen nicht zufriedenstellend ist, zeigt diese Studie am Beispiel der TOBSY-Mischsequenz, dass das HF-Modulationsprofil des Pulses weiter optimiert werden kann, um die Effizienz zu steigern. In den folgenden Kapiteln wird die hier vorgestellte Optimierungsmethode auch auf andere Mischsequenzen angewandt. Zusätzliche Erweiterungen sind vorstellbar, auch wenn diese rechenzeitaufwendig sind: Mischsequenzen können generiert werden (i) unter expliziter Einbeziehung von HF-Feldinhomogenitäten, (ii) unter Benutzung von phasen- und amplitudenmodulierten Pulsen, um den HF-Leistungsfaktor zu verringern, (iii) unter expliziter Minimierung von Relaxationsverlusten. Denkbar ist auch, die lokale Optimierung durch globale Optimierungsprozeduren wie GA zu ersetzen. Die zu erwartende längere Rechenzeit kann dabei unter anderem durch heuristische Suche verringert werden. Eine weitere Alternative sind auf „optimal control theory“-gestützte Algorithmen [53].

## Kapitel 5

# Numerische Konstruktion symmetriebasierter $CN_n^v$ -Pulssequenzen

### 5.1 Einleitung

Die symmetriebasierte Methode bietet eine bequeme Plattform, um verschiedene Pulssequenzen in MAS-Festkörper-NMR-Studien an biologischen Systemen zu implementieren. Diese können der Resonanzzuordnung als auch der Gewinnung von strukturellen Informationen dienen. So wird zum Beispiel POST-C7 [40], die homonukleare Doppelquanten (DQ)-Rückkopplungssequenz  $C7_2^1$  mit dem Basiselement  $\{(\pi/2)_0(2\pi)_\pi(3\pi/2)_0\}$ , verwendet, um  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren mittels longitudinalem Magnetisierungsaustausch, Doppelquanten-NMR-Spektroskopie und Doppelquanten-gefilterter Magnetisierungsübertragung zu generieren [37]. Wie bereits erwähnt (siehe Kap. 4), wird die Anwendbarkeit von symmetriebasierten HF-Pulssequenzen basierend auf konventionellen Rechteckpulsen durch die Abhängigkeit der HF-Feldstärke von der Drehfrequenz beschränkt. Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass diese Schwierigkeiten prinzipiell überwunden werden können, indem phasen-/amplitudenmodulierte Basiselemente, welche an die jeweiligen experimentellen Anforderungen bzw. Einschränkungen angepasst sind, verwendet werden. Dies wurde am Beispiel der symmetriebasierten  $C9_{15}^1$ -Pulssequenz und der Darstellung des Phasenmodulationsprofils des Basiselements als Fourierreihe demonstriert. Einer der Vorteile der Verwendung der Fourierdarstellung ist, dass im Allgemeinen nur eine kleine Anzahl von zu optimierenden Parametern vonnöten ist, was die Rechenzeit erheblich reduziert. Obwohl dieser Ansatz zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte, sollte erwähnt werden, dass diese Darstellung den Lösungsraum der optimalen Pulsprofile beschränkt. Da auch der Erfolg des lokalen Optimierungsschritts von guten Startwerten abhängt, sollte es von Vorteil

sein, auch für die Startwerte verschiedene Lösungsräume zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wird in diesem Kapitel ein alternativer Ansatz betrachtet, um symmetriebasierte  $CN_n^V$ -Sequenzen ohne Verlängerung der Rechenzeit zu optimieren. Ausschlaggebend hierbei ist, dass das Rückkoppeln und Entkoppeln verschiedener nuklearer Wechselwirkungen mittels der symmetriebasierten Methode oft die Anwendung von Basiselementen kurzer Länge beinhaltet [66]. Aufgründdessen ist es möglich, solche C-Basiselemente in eine kleine Zahl „ $N_t$ “ von Intervallen gleicher Länge einzuteilen. Zu optimieren sind dann die Amplituden- bzw. Phasenwerte jedes Einzelintervalls. Die Anzahl der unabhängigen Parameter „ $N_t$ “ kann auch reduziert werden, um Rechenzeit zu sparen, zum Beispiel über Symmetrieeinschränkungen des Pulses. Mit solch einem Ansatz wurden symmetriebasierte DQ-Rückkopplungs- sowie TOBSY-Pulssequenzen unter Verwendung phasenmodulierter C-Basiselemente mit konstanter Amplitude und  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit generiert. Aufgrund der Tatsache, dass typischerweise längere Mischzeiten für TOBSY-Magnetisierungsübertragungen notwendig sind, können die Interferenzeffekte zwischen den  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -HF-Feldern während der Mischzeit beträchtlich sein, falls die Diskrepanz der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -HF-Feldstärken nicht groß genug gewählt werden kann. Darum wurden hier auch TOBSY-Sequenzen ohne gleichzeitige  $^1\text{H}$ -Entkopplung generiert.

### 5.1.1 Doppelquanten-Rückkopplung

Obwohl nur Einquanten-Kohärenzen beobachtbar sind, bauen viele NMR-Experimente auf der Erzeugung von Multiquanten-Kohärenzen auf. So werden Doppelquanten-Kohärenzen genutzt, um Torsionswinkel zu bestimmen und um Störsignale isolierter Kerne zu eliminieren. Ausserdem ist es möglich, Korrelationen zwischen Kernen mit sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen aufzulösen. Diese Experimente bauen auf Rückkopplungssequenzen auf, welche einen Doppelquanten-Hamiltonoperator des Typs

$$\mathcal{H}_{DQ} = \frac{\Omega^{12}}{2}(I_j^+ I_k^+ + I_j^- I_k^-)$$

generieren, wobei  $\Omega^{12}$  ein von der Größe und der Orientierung der dipolaren Kopplung abhängiger Koeffizient ist. Unter dem Einfluss dieses Hamiltonoperators für eine Dauer  $\tau$  entwickelt sich die Summe der Magnetisierung  $(I_{jz} + I_{kz})$  der zwei koppelnden Kerne nach

$$\frac{1}{2}(I_{jz} + I_{kz}) \rightarrow \frac{1}{2}(I_{jz} + I_{kz}) \cos(\Omega^{12}\tau) + \frac{i}{2}(I_j^+ I_k^+ - I_j^- I_k^-) \sin(\Omega^{12}\tau),$$

während die Differenz ( $I_{jz} - I_{kz}$ ) nicht beeinflusst wird. Somit wird Magnetisierung auf die koppelnden Kerne übertragen (erster Term) und gleichzeitig Doppelquanten-Übergänge angeregt (zweiter Term). In Doppelquanten-Magnetisierungsübertragungsexperimenten wird der erste Term ausgewählt. Man erhält eine Korrelation der chemischen Verschiebungen aller Kerne. In Doppelquanten-NMR-Experimenten ist hauptsächlich der DQ-Term von Interesse. Doppelquanten-Kohärenzen werden generiert und entwickeln sich während der Zeitspanne  $t_1$ . Das Resultat ist eine Korrelation der chemischen Verschiebung mit den Doppelquanten-Frequenzen, welche der Summe der chemischen Verschiebungen der koppelnden Kerne entsprechen. Eine weitere Variante ist das DQ-gefilterte Magnetisierungsübertragungsexperiment, in denen die letztendlich detektierte Magnetisierung durch eine Doppelquanten-Kohärenz gegangen sein muss. Abermals erhält man eine Korrelation der chemischen Verschiebung, wobei die Signale isolierter Kerne herausgefiltert werden.

Um symmetriebasierte  $\gamma$ -kodierte homonukleare DQ-Rückkopplung zu erreichen, werden explizit Terme mit  $(l, m, \lambda, \mu) = (2, \pm 1, 2, \pm 2)$  oder  $(2, \pm 1, 2, \mp 2)$  erlaubt [66].

## 5.2 Numerische und experimentelle Methoden

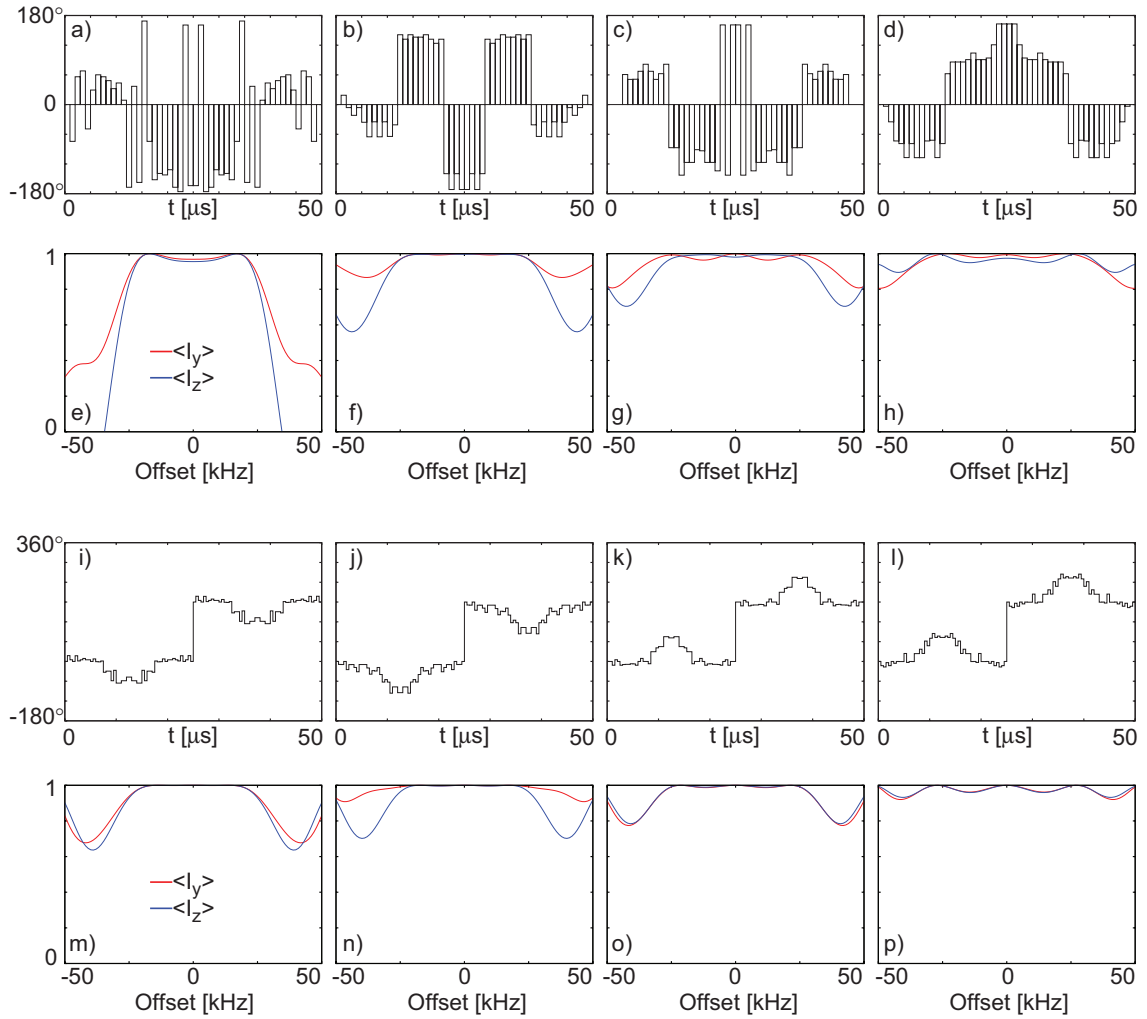
Der generelle Ablauf der Optimierung symmetriebasierter Sequenzen in diesem und den folgenden Kapiteln lässt sich wie folgt zusammenfassen: Zuerst wurden die symmetriebasierten Sequenzen unter Beachtung experimenteller Bedingungen, wie der verwendeten MAS-Frequenz sowie der zur Verfügung stehenden bzw. erlaubten HF-Feldstärke, ausgewählt. Im zweiten Schritt wurden phasenmodulierte HF-Pulse der benötigten Länge unter Betrachtung eines Spin- $\frac{1}{2}$ -Systems und verschiedener Inversions-/Nullrotationsbandbreiten mit der globalen Optimierungsmethode *Genetic Algorithms* generiert. Im letzten Schritt wurden diese Pulse als Start-Basiselemente symmetriebasierter Sequenzen genutzt und das HF-Modulationsprofil dieses Basiselements mit der lokalen Optimierungsprozedur NL2SOL, welche im SPINEVOLUTION-Programm integriert ist, weiter optimiert, um HF-Pulssequenzen mit zufriedenstellender Charakteristik der Magnetisierungsübertragung im benötigten Bereich der Resonanzoffsets und HF-Feldinhomogenitäten zu generieren.

C-Basiselemente mit geeigneten Längen, welche durch die Symmetrie und die MAS-Frequenz festgelegt sind, wurden entweder als Verbund zweier Breitbandinversionspulse nach dem  $\{x\bar{x}\}$ -Schema oder direkt als Breitband- $2\pi$ -Pulse generiert. Mittels GA wurden phasenmodulierte  $180^\circ$ - bzw.  $360^\circ$ -Pulse mit konstanter Amplitude generiert. Diese soll-

ten zu einer Inversion der Magnetisierung ( $\langle I_z \rangle \rightarrow -\langle I_z \rangle$ ) bzw. zu einem Entwicklungsoperator  $\exp(i2\pi I_x)$  über den gewünschten Resonanzbereich führen. Im Allgemeinen wurde eine Populationsgröße von 500 und 500 Generationen im Optimierungsprozess verwendet. Die Pulse wurden in eine kleine Zahl von Intervallen gleicher Länge eingeteilt, wobei jedes Einzelintervall durch einen Phasenwert charakterisiert ist. Die verwendeten HF-Feldstärken befanden sich im Bereich von 40-50 kHz bzw. 100-120 kHz, abhängig davon, ob die Pulse für Sequenzen mit bzw. ohne gleichzeitige  $^1\text{H}$ -Entkopplung verwendet werden sollen.  $180^\circ$ -Pulse wurden so konstruiert, dass das Phasenmodulationsprofil symmetrisch bezüglich der Mitte des Pulses ist.  $360^\circ$ -Pulse wurden entweder so generiert, dass das Phasenmodulationsprofil symmetrisch bezüglich der Mitte des Pulses ist (Typ I), oder dass das Phasenmodulationsprofil der ersten Hälfte des Pulses um  $180^\circ$  phasenverschoben zur zweiten Hälfte ist und jede Hälfte symmetrisch bezüglich ihrer Mitte ist (Typ II). Da die Leistung der symmetriebasierten Sequenzen unter Verwendung der aus der GA-Optimierung stammenden C-Elemente nicht zufriedenstellend war, wurden die Phasenmodulationsprofile mittels der NL2SOL-Prozedur weiter numerisch optimiert (siehe Kap. 4).

Als repräsentative Beispiele wurden die Symmetrien  $C7_{10}^2$  und  $C8_{10}^3$  untersucht, um  $\gamma$ -kodierte  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkopplungssequenzen zu erhalten. Weiterhin wurde die  $C9_{15}^1$ -Symmetrie benutzt, um  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -TOBSY-Spektren zu generieren. Symmetriebasierte Sequenzen mit bzw. ohne gleichzeitige  $^1\text{H}$ -Entkopplung wurden unter Berücksichtigung eines  $^{13}\text{C}1$ - $^{13}\text{C}2$ - bzw. eines  $^1\text{H}1$ - $^{13}\text{C}1$ - $^{13}\text{C}2$ - $^1\text{H}2$ -Spinsystems erstellt. Die Resonanzoffsetbereiche von  $\pm 10$  bzw.  $\pm 15$  kHz wurden verwendet. Numerische Simulationen zeigen, dass DQ-Rückkopplungssequenzen wie POST-C7 ihre maximale Magnetisierungsübertragung ( $\langle I_{1z} \rangle \rightarrow -\langle I_{2z} \rangle$ ) im idealen Fall bei ca. 1,1 ms erreichen (Daten nicht gezeigt). Das Kriterium zur Optimierung der DQ-Rückkopplungssequenzen bestand aus der Maximierung der nach einer Mischzeit von ca. 1,1 ms auf den zweiten Kohlenstoffspin übertragenen longitudinalen Magnetisierung. Für TOBSY-Sequenzen wurde das Phasenmodulationsprofil des Basiselements optimiert, so dass die Magnetisierung an dem der Theorie entsprechenden Zeitpunkt  $\tau_{mix} = (1/2J_{CC})$  (siehe Kap. 3.1.3) vollständig von einem Kohlenstoff auf den anderen ( $\langle I_{1z} \rangle \rightarrow \langle I_{2z} \rangle$ ) übertragen wurde. Weitere Details der Optimierungsprozedur entsprachen denen aus Kapitel 4. In diesem Kapitel wurde im Allgemeinen noch ein finaler Optimierungsschritt mit einer etwas größeren Anzahl von 84 Kristallorientierungen durchgeführt.

Alle Spektren wurden mit L-Histidin- sowie L-Argenin-Proben generiert. Die Luftküh-

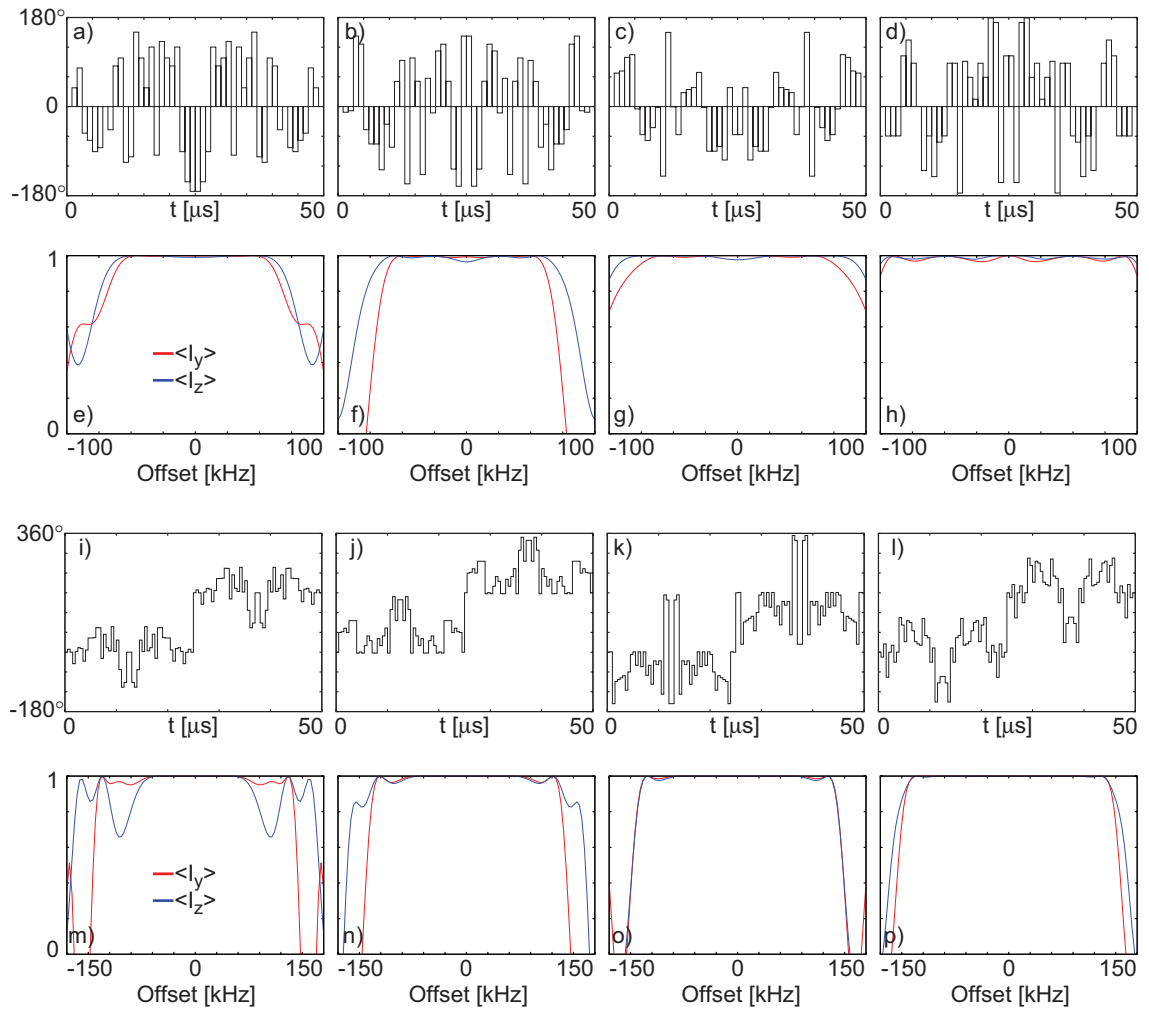


**Abb. 5.1:** (a-d) Phasenprofile der 360°-Pulse von 50  $\mu\text{s}$  Länge des Typs I, unterteilt in 50 Einzelintervalle konstanter Amplitude und gleicher Länge, generiert unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 50 kHz und Bandbreiten von (a) 40 kHz, (b) 50 kHz, (c) 60 kHz, (d) 70 kHz. Die Grafiken (e-h) zeigen die resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse, beginnend mit  $\langle I_y \rangle$ - und  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, unter Berücksichtigung eines Spin- $\frac{1}{2}$ -Systems. (i-l) zeigen die Phasenmodulationsprofile von 360°-Pulsen des Typs II mit konstanter Amplitude und 50  $\mu\text{s}$  Länge, unterteilt in 100 Einzelintervalle unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 50 kHz und Bandbreiten von (i) 40 kHz, (j) 50 kHz, (k) 60 kHz, (l) 70 kHz. Die Grafiken (m-p) zeigen die entsprechende resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse. Die HF-Phasenwerte der ersten 25 Einzelintervalle sind im Anhang gegeben.

lung wurde bei einer Temperatur von  $\approx -50^\circ\text{C}$  gehalten, was einer Proben temperatur von ca.  $0^\circ\text{C}$  bei einer Drehfrequenz von 33,333 kHz entspricht.

### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

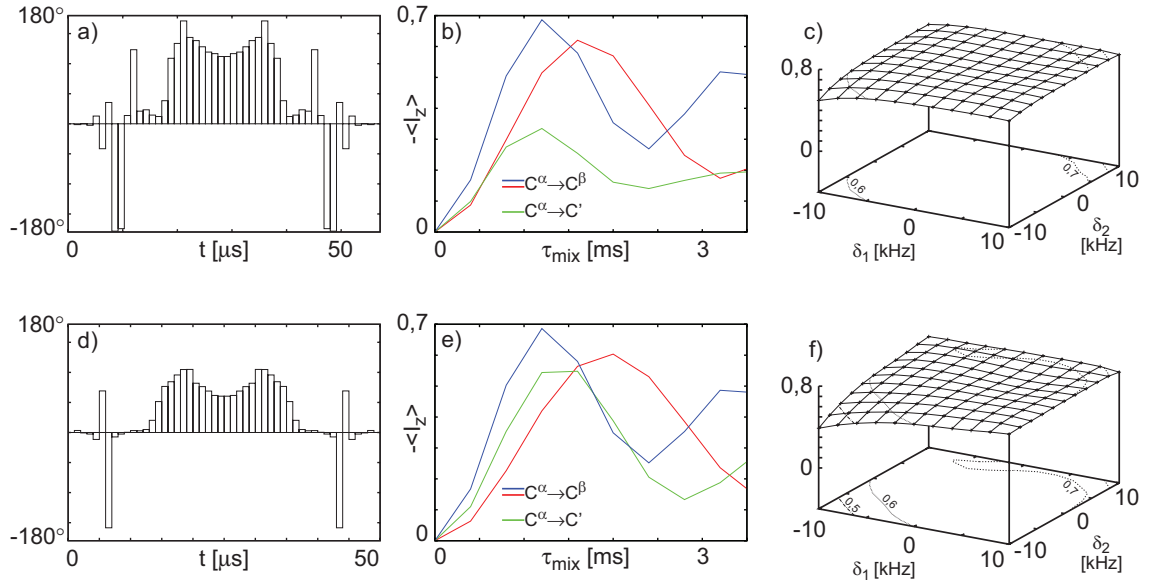
Die phasenmodulierten 180°- und 360°-Pulse der benötigten Längen wurden unter Berücksichtigung der geforderten Bandbreiten mittels GA generiert. In Abb. 5.1 und 5.2 sind als repräsentative Beispiele die Phasenmodulationsprofile und die Leistungscharakteristika einiger  $2\pi$ -Pulse zu sehen. Die in Abb. 5.1a-h dargestellten 360°-Pulse von 50  $\mu\text{s}$  Länge (Typ I) wurden für eine HF-Feldstärke von 50 kHz und  $N_t=50$  generiert. In Abb.



**Abb. 5.2:** (a-d) Phasenprofil der  $360^\circ$ -Pulse von  $50 \mu\text{s}$  Länge des Typs I, unterteilt in 50 Einzelintervalle konstanter Amplitude und gleicher Länge, generiert unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 120 kHz und Bandbreiten von (a) 60 kHz, (b) 100 kHz, (c) 140 kHz, (d) 180 kHz. Die Grafiken (e-h) zeigen die resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse, beginnend mit  $\langle I_y \rangle$ - und  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, unter Berücksichtigung eines Spin- $\frac{1}{2}$ -Systems. (i-l) zeigen die Phasenmodulationsprofile von  $360^\circ$ -Pulsen des Typs II mit konstanter Amplitude und  $50 \mu\text{s}$  Länge, unterteilt in 100 Einzelintervalle unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 120 kHz und Bandbreiten von (i) 60 kHz, (j) 100 kHz, (k) 140 kHz, (l) 180 kHz. Die Grafiken (m-p) zeigen die entsprechende resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse. Die HF-Phasenwerte der ersten 25 Einzelpulse sind im Anhang gegeben

5.1i-p sind  $360^\circ$ -Pulse von  $50 \mu\text{s}$  Länge (Typ II) zu sehen, welche mit einer HF-Feldstärke von 50 kHz und  $N_t=100$  erstellt wurden. Die für eine HF-Feldstärke von 120 kHz und mit  $N_t=50$  erstellten  $360^\circ$ -Pulse von  $50 \mu\text{s}$  Länge (Typ I) sind in Abb. 5.2a-h dargestellt. Die graphischen Darstellungen in Abb. 5.2i-p zeigen  $360^\circ$ -Pulsen von  $50 \mu\text{s}$  Länge (Typ II), welche mit einer HF-Feldstärke von 120 kHz und  $N_t=100$  erstellt wurden. Weitere Parameter können den Bilduntertiteln entnommen werden. Mittels eines Mac Pro war es möglich, solche Pulse in kurzer Zeit (<15min) zu generieren. Die Leistung dieser Pulse wird dabei, wie erwartet, nur unerheblich durch geringe Variationen der HF-Feldstärke gestört. Auch hier sind die phasenmodulierten Pulse wie konventionelle Pulse skalierbar.

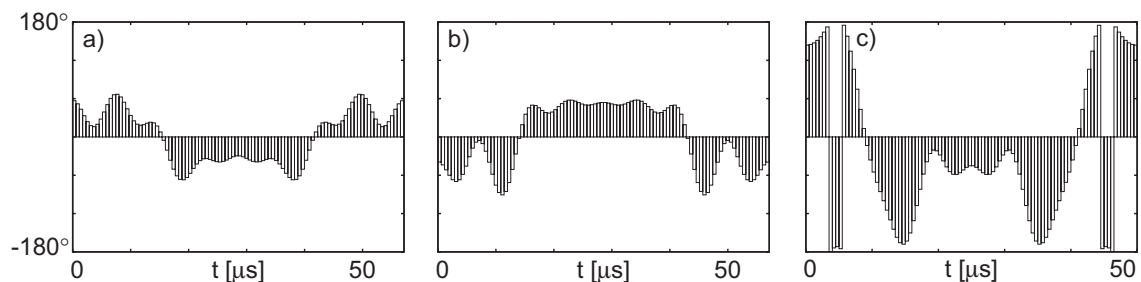




**Abb. 5.3:** Simulierte Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung der (a-c)  $C7_{10}^2$ - und (d-f)  $C8_{10}^3$ -Symmetrien sowie (a,d) die Phasenmodulationsprofile des C-Basiselements von 57,14 bzw. 50  $\mu$ s Dauer. Die Simulationen wurden durchgeführt mit einer Drehfrequenz von 25 kHz, für eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von 500 MHz, und HF-Feldstärken von (b,c) 44 kHz und (e,f) 45 kHz. Die Darstellungen in (b,e) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1. Die Simulationen für die  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}^\beta$ - und  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$ -Magnetisierungsübertragung wurden durchgeführt unter Verwendung der Parameter für Alanin- und Glyzin-Spinsysteme aus Abb. 3.3, wobei die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz auf die Mitte der beiden Kohlenstoffresonanzen (Plots in Blau) bzw. auf 110 ppm (Grün und Rot) gesetzt wurde. Plots in (c,f) zeigen als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne die Größe der auf Spin 2 übertragenen Magnetisierung nach  $\tau_{\text{mix}}=1,2$  ms, beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffs. Die HF-Phasenwerte der ersten 25 Einzelintervalle sind im Anhang gegeben.

Verlängert man den Puls um das Doppelte, so benötigt dieser die halbe HF-Feldstärke und besitzt ebenso nur die halbe Bandbreite. Die simulierten Ergebnisse zeigen deutlich das Potenzial der GA-Methode, phasenmodulierte, breitbandige HF-Pulse zu generieren, welche in eine kleine Zahl „ $N_t$ “ von Intervallen gleicher Länge eingeteilt werden, wobei jedes Einzelintervall durch die dazugehörige HF-Phase charakterisiert ist. Da diese Pulse nur als Startpunkt für die weitere numerische Optimierungsprozedur verwendet wurden, wurde nicht versucht, die Parameter der GA-Optimierung zu verbessern.

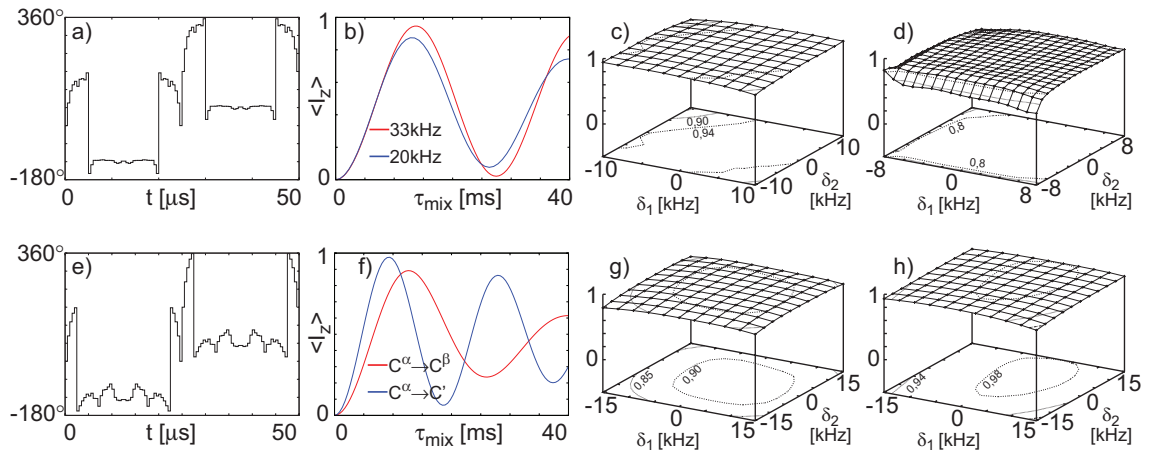
Ausgehend von verschiedenen mittels GA generierten C-Elementen wurden weitere numerische Optimierungsläufe durchgeführt, um eine zufriedenstellende Leistung der gewählten symmetriebasierten Sequenz zu erreichen. Im Allgemeinen war es möglich, für jede Symmetrie eine Vielzahl von Basiselementen zu generieren, wobei die Rechenzeit unter Verwendung eines Mac Pro mit vier Prozessoren nur wenige Stunden betrug. Die simulierten Leistungscharakteristika der numerisch optimierten Symmetrien  $C8_{10}^3$  und  $C7_{10}^2$  sind in Abb. 5.3 abgebildet, zusammen mit dem dazugehörigen Phasenmodula-



**Abb. 5.4:** Repräsentative Phasenmodulationsprofile der C-Basiselemente, welche wie in Kapitel 4 als Teilsumme einer Fourierreihe dargestellt wurden, mit Pulslängen von 57,14  $\mu\text{s}$  und 50  $\mu\text{s}$ . Diese Pulse wurden generiert für (a,b)  $C7_{10}^2$ - und (c)  $C8_{10}^3$ -Symmetrien, für eine Drehfrequenz von 25 kHz unter Verwendung von HF-Feldstärken von (a,b) 44 kHz und (c) 50 kHz. Für die Simulationen wurden die Pulse in 100 Intervalle gleicher Länge unterteilt. Die entsprechenden Fourier-Koeffizienten sind im Anhang gegeben.

tionsprofil (Abb. 5.3a,d) des C-Basiselementes. Die Graphen in Abb. 5.3b,e zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff-Spin übertragenen Magnetisierung als Funktion der Mischzeit. Obwohl die Basiselemente für ein  $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}^\beta$ -Alanin-Spinsystem generiert wurden, sieht man, dass zufriedenstellende Leistung auch für  $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}'$ -Glyzin-Spinsysteme erreicht wird, in denen ein Kohlenstoff eine große CSA besitzt. Abb. 5.3c,f zeigen als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Spin 2 bei  $\tau_{\text{mix}} = 1,2 \text{ ms}$ , beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffspins. Man sieht, dass die Leistungscharakteristika der Sequenzen nicht sehr stark von den Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne abhängen. Aufgrunddessen wird eine zufriedenstellende DQ-Rückkopplung im gesamten spektralen  $^{13}\text{C}$ -Bereich, bei moderaten Zeeman-Feldstärken, erwartet. Somit ist aus Abb. 5.3 ersichtlich, dass effektive DQ-Rückkopplungssequenzen sogar bei hohen MAS-Frequenzen mit moderaten  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken von 50 kHz oder weniger generiert werden können. Erwähnenswert ist auch, dass es möglich war, zufriedenstellende DQ-Rückkopplung mittels phasenmodulierter C-Basiselemente, deren HF-Phasenmodulationsprofil in Form einer Teilsumme einer Fourierreihe dargestellt wurde, zu erhalten (Abb. 5.4). Die Leistung war vergleichbar mit den Darstellungen aus Abb. 5.3 (Daten nicht gezeigt). Auffallend in allen numerischen Simulationen war auch, dass die hier vorgestellten symmetriebasierten Sequenzen automatisch eine angemessene Toleranz gegenüber HF-Feldinhomogenitäten bieten, obwohl solche Inhomogenitäten nicht explizit berücksichtigt wurden (Daten nicht gezeigt).

Die TOBSY-Optimierungen für Mischsequenzen mit gleichzeitiger  $^1\text{H}$ -Entkopplung wurden mit der  $C9_{15}^1$ -Symmetrie, unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 50 kHz, einer Drehfrequenz von 33,333 kHz und einem Resonanzoffsetbereich von  $\pm 10 \text{ kHz}$  durch-



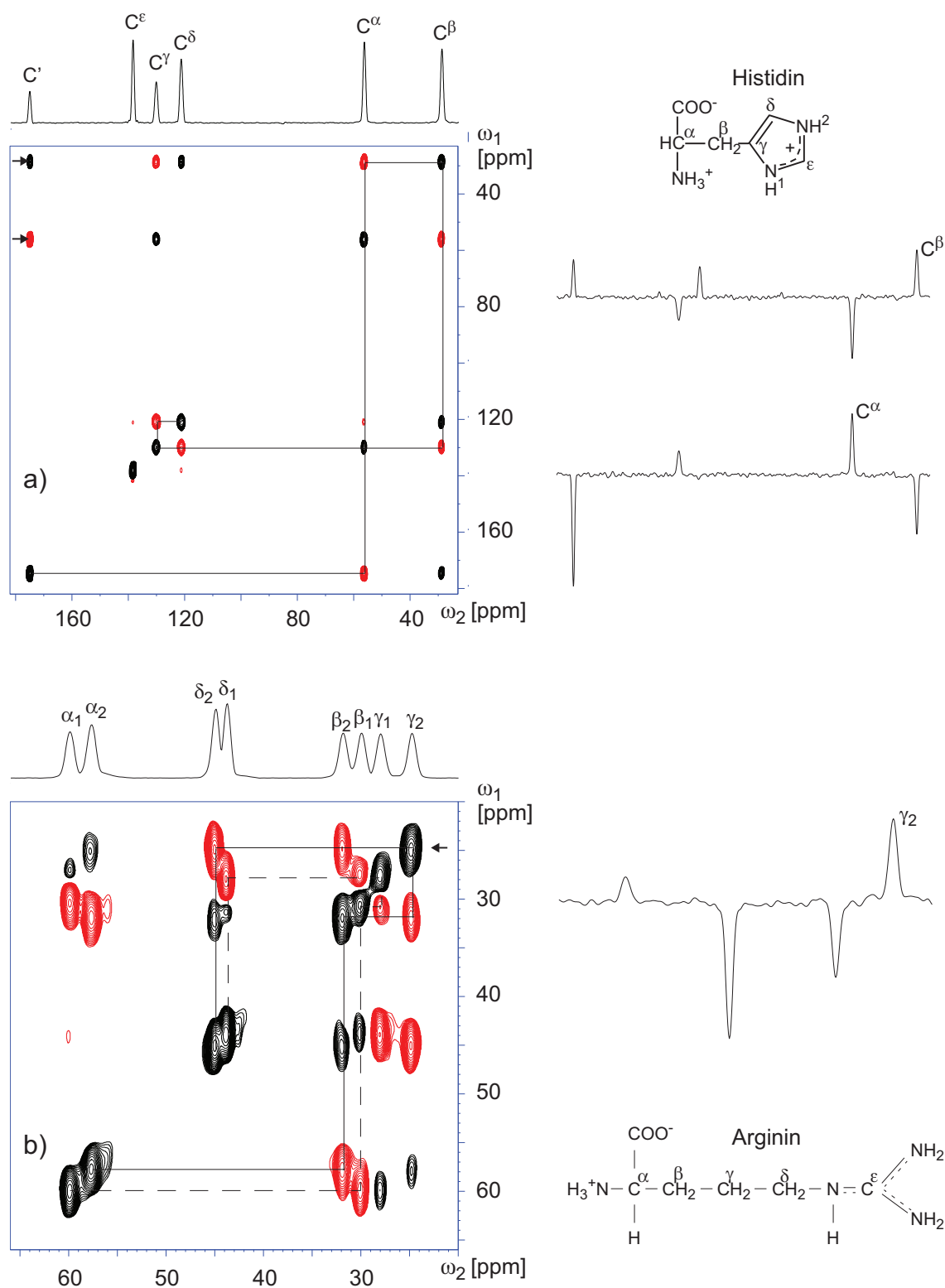
**Abb. 5.5:** Simulierte Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung der symmetrie-basierten  $C9_{15}^1$  HF-Pulssequenz. Das optimierte Phasenmodulationsprofil des C-Basiselements von 50  $\mu s$  Länge in (a) wurde generiert unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 50 kHz und einer Drehfrequenz von 33,333 kHz. Die Darstellungen in (b) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1. Diese wurden generiert unter Verwendung von Parametern für ein ( $^{13}C^\alpha, ^{13}C^\beta$ )-Alanin-Spinsystem (siehe Abb. 3.3), wobei die  $^{13}C$ -Trägerfrequenz in die Mitte der beiden Kohlenstoffresonanzen gesetzt wurde. Die Darstellungen der Magnetisierungsübertragung für eine Drehfrequenz von 20 kHz wurden mittels des gleichen Basiselements aus (a), einer HF-Feldstärke von 30 kHz und einer Länge des Basiselements von 83,33  $\mu s$  erhalten. Die Graphen in (c,d) zeigen als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne die Größe der auf Spin 2 übertragenen Magnetisierung bei  $\tau_{mix} \approx 14$  ms, beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffs. Das optimierte Phasenmodulationsprofil des C-Basiselements von 50  $\mu s$  Länge in (e) wurde generiert unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 120 kHz und einer Drehfrequenz von 33,333 kHz. Die simulierten Darstellungen in (f) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff ( $^{13}C^\beta/^{13}C'$ ) übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1 ( $^{13}C^\alpha$ ). Die  $^{13}C^\alpha \rightarrow ^{13}C^\beta$ - bzw.  $^{13}C^\alpha \rightarrow ^{13}C'$ -Magnetisierungsübertragung ist in (g,h) abgebildet. Als Funktion der Resonanzoffsets der skalar gekoppelten Kerne ist die Größe der auf Spin 2 übertragenen Magnetisierung bei  $\tau_{mix} \approx 14$  bzw. 9,5 ms, beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffs, zu sehen. Die HF-Phasenwerte der ersten 25 Einzelintervalle der C-Basiselemente sind im Anhang gegeben. Weitere Parameter der numerischen Simulationen (f-h) entsprachen denen von Abb. 3.3.

geführt. In diesem Fall führte die Verwendung von 360°-Pulsen des Typs II als Startwerte der lokalen Optimierung zu zufriedenstellenden Lösungen. Abb. 5.5a zeigt das Phasenmodulationsprofil eines der so generierten C-Basiselemente. Die entsprechenden simulierten Magnetisierungsübertragungskurven (Abb. 5.5b) erreichen fast das theoretische Maximum der vollständigen Polarisationsübertragung für den  $^{13}C^\alpha \rightarrow ^{13}C^\beta$ -Magnetisierungsübertrag. Aufgrunddessen sollte die  $C9_{15}^1$ -Symmetrie mit solch einem numerisch optimierten Basiselement effektiv für TOBSY-Experimente in der aliphatischen Region von Peptiden und Proteinen genutzt werden können. Die Leistung unter Berücksichtigung eines  $^{13}C^\alpha$ - $^{13}C'$ -Glyzin-Spinsystems war aber nicht zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt). Die graphische Darstellung in Abb. 5.5c zeigt, als Funktion der Resonanzoffsets der skalar gekoppelten Kerne, die Größe der übertragenen Magnetisie-

rung auf Spin 2 bei einer Mischzeit von  $\approx 14$  ms, beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffspins. Man sieht deutlich, dass diese Sequenz eine effiziente Magnetisierungsübertragung auch für eine große Bandbreite ermöglicht. Für eine gegebene Symmetrie ist es im Allgemeinen von Vorteil, die HF-Pulscharakteristika des C-Basiselements unter Berücksichtigung der zu verwendenden Drehfrequenz zu optimieren. Nichtsdestotrotz ist es in manchen Situationen möglich, das gleiche Basiselement bei verschiedenen MAS-Frequenzen einzusetzen, unter Benutzung entsprechend skalierten Pulslängen und HF-Feldstärken, und zufriedenstellende TOBSY-Leistung zu erhalten. Zum Beispiel ist die Leistung der  $C9_{15}^1$ -Symmetrie bei Benutzung des Basiselements aus Abb. 5.5a und einer Drehfrequenz von 20 kHz (Abb. 5.5b,d) gut genug, um eine effiziente TOBSY-Magnetisierungsübertragung im gesamten aliphatischen spektralen Bereich von Peptiden und Proteinen zu realisieren.

Es konnten auch TOBSY-Mischsequenzen erstellt werden, welche keine Einstrahlung von  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit erfordern. Das für solch einen Fall optimierte C-Basiselement sowie die Charakteristika der TOBSY-Magnetisierungsübertragung mit der  $C9_{15}^1$ -Symmetrie sind in Abb. 5.5e-h abgebildet. Die Simulationen wurden für eine Drehfrequenz von 33,333 kHz und eine HF-Feldstärke von 120 kHz durchgeführt. Die Magnetisierungsübertragungskurven (Abb. 5.5f) wurden mit einer  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 110 ppm generiert. Abb. 5.5g und h zeigen die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung als Funktion der Resonanzoffsets der zwei gekoppelten Kerne. Obwohl die optimierten Basiselemente unter Berücksichtigung von Parametern eines Alanin-Spinsystems generiert wurden, sieht man, dass zufriedenstellende Leistung auch im Fall einer  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$  Magnetisierungsübertragung erreicht wird. Es sollte erwähnt werden, dass das die Leistung des Basiselements aus Abb. 5.5e vergleichbar mit der des Basiselements aus Abb. 4.6b ist, bei der das HF-Phasenmodulationsprofil durch eine Teilsumme einer Fourierreihe dargestellt wurde.

Die Leistungscharakteristika der hier beschriebenen symmetriebasierten Sequenzen wurden auch mittels experimenteller Messungen untersucht. Die  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung von polykristallinen Proben von L-Histidin und L-Arginin sind in Abb. 5.6a,b gezeigt, zusammen mit einigen Querschnitten zur Verdeutlichung der spektralen Qualität. Diese wurden mittels der  $C7_{10}^2$ - und  $C8_{10}^3$ -Symmetrien und einer Drehfrequenz von 25 kHz unter Benutzung numerisch optimierter Basiselemente generiert. Der Theorie entsprechend zeigen die Spektren und Querschnitte Kreuzsignale resultierend aus direkter und weitergeleiteter Magnetisierungsübertragung mit

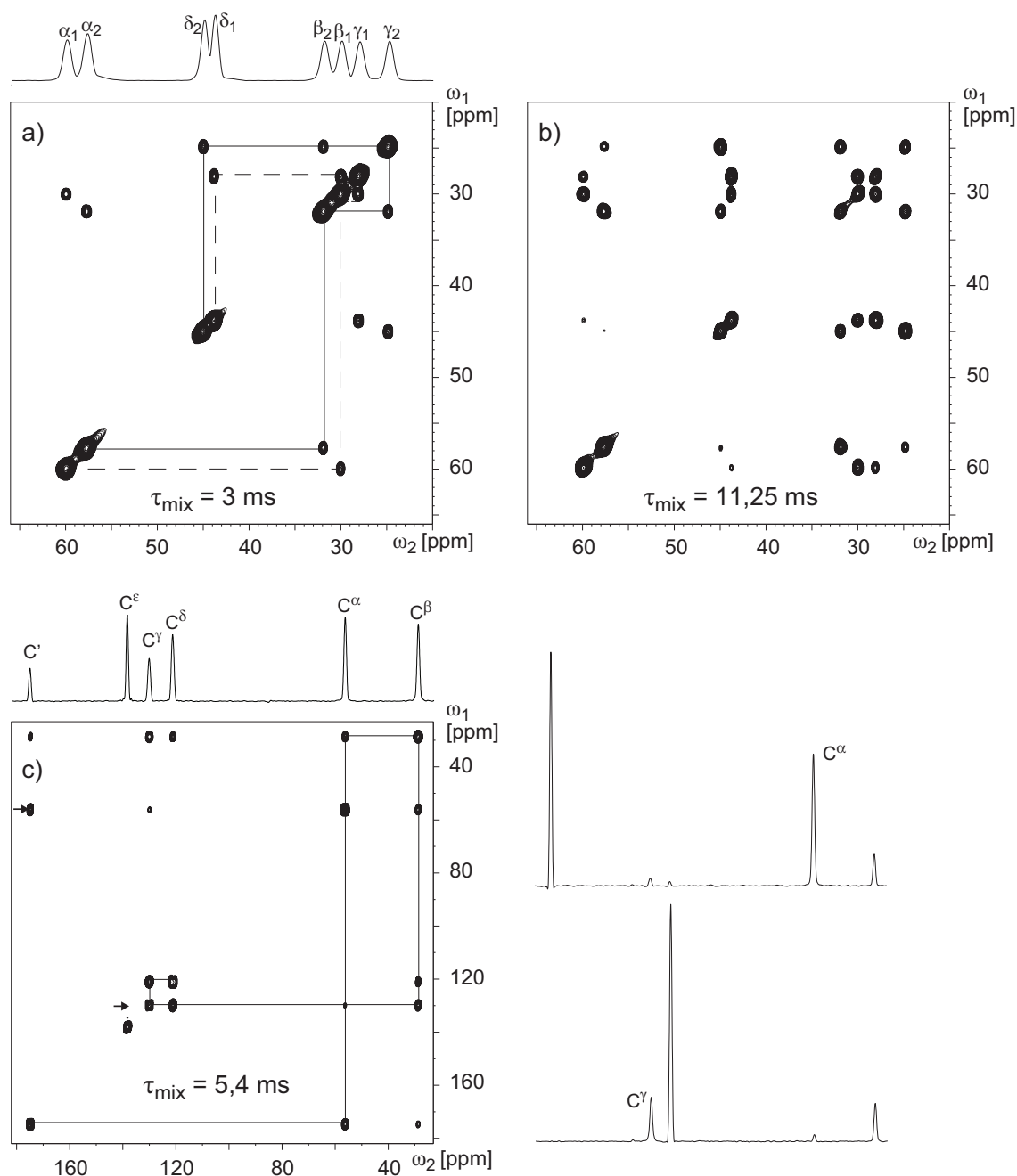


**Abb. 5.6:** 2D- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung von (a) L-Histidin und (b) L-Arginin unter Verwendung der dipolaren DQ-Rückkopplungssequenzen (a)  $\text{C}7_{10}^2$  und (b)  $\text{C}8_{10}^3$  und dem entsprechenden numerisch optimierten C-Basiselement aus Abb. 5.3. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von 25 kHz, eine Mischzeit von 1,2 ms, passende  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken, 32 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 64  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 25000 Hz, eine Regenerierungszeit von (a) 2 s bzw. (b) 4 s und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 100 ppm. (b) zeigt eine vergrößerte Darstellung der aliphatischen Region. Repräsentative spektrale Querschnitte sind gegeben. Für jedes aliphatische Argininkohlenstoff sind zwei Resonanzen zu sehen, aufgrund der Präsenz zweier verschiedener Kristallformen [5].

gegensätzlichen Signalintensitäten. Wie erwartet, sind in allen Spektren starke Kreuzsignalintensitäten im gesamten spektralen Bereich zu sehen. Abb. 5.7a,b zeigen TOBSY-Spektren der aliphatischen Region von L-Arginin unter Benutzung der  $C9_{15}^1$ -Sequenz. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von 20 kHz, das numerisch optimierte phasenmodulierte Basiselement aus Abb. 5.5a und Mischzeiten von 3,0 ms (Abb. 5.7a) und 11,25 ms (Abb. 5.7b). Das Spektrum in Abb. 5.7c wurde generiert mit der symmetriebasierten  $C9_{15}^1$ -HF-Pulssequenz und dem in Abb. 5.5e abgebildeten C-Basiselement ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit bei einer Drehfrequenz von 33,333 kHz. Auch in diesen Spektren sind Kreuzsignale, welche aus direkter und weitergeleiteter Magnetisierungsübertragung resultieren, von beträchtlicher Intensität zu sehen, sowohl mit als auch ohne Verwendung von  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. Somit ist in Übereinstimmung mit den Resultaten der numerischen Simulationen ersichtlich, dass optimierte symmetriebasierte  $CN_n^V$ -TOBSY- und DQ-Rückkopplungssequenzen effektiv für Studien an isotopen-markierten biologischen Proben bei hohen MAS-Frequenzen verwendet werden können.

Anfängliche Untersuchungen zur numerischen Optimierung von DQ-Pulssequenzen ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit wurden ebenfalls durchgeführt. Die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung für ein repräsentatives C-Basiselement sind in Abb. 5.8 dargestellt. Obwohl der maximale Wert der übertragenen Magnetisierung geringer ist als in Abb. 5.3, führte die Sequenz zu einem DQ-NMR-Spektrum mit sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis (Abb. 5.9b). Dabei wurde die Pulssequenz aus Abb. 5.9a genutzt. Dieses vielversprechende Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass die Interferenz zwischen Rückkopplungs- und Entkopplungskanal, welche in den Simulationen zu Abb. 5.3 nicht berücksichtigt ist, vollständig eliminiert ist. Weitere Untersuchungen sind geplant, um die Wirksamkeit zu verbessern.

Dieses Kapitel demonstriert eine Vorgehensweise, um das Potenzial der symmetriebasierten Methode auszunutzen. Verschiedene HF-Pulssequenzen, welche grundlegend für Studien an biologischen Systemen sind, wurden optimiert. Zum Rückkoppeln und Entkoppeln der relevanten Kernspin-Wechselwirkungen war es bisher gängige Praxis, die Leistung von verschiedenen erlaubten Symmetrien unter Verwendung einer Vielzahl von Basiselementen, welche auf zusammengesetzte Rechteckpulse basieren, zu untersuchen. Im Gegensatz dazu hat die hier vorliegende Studie gezeigt, dass es möglich ist, die Charakteristika des Basiselementes für jede Symmetrie maßzuschneidern, um die bestmögliche Leistung der gewählten Symmetrie zu realisieren. In diesem Kapitel wird



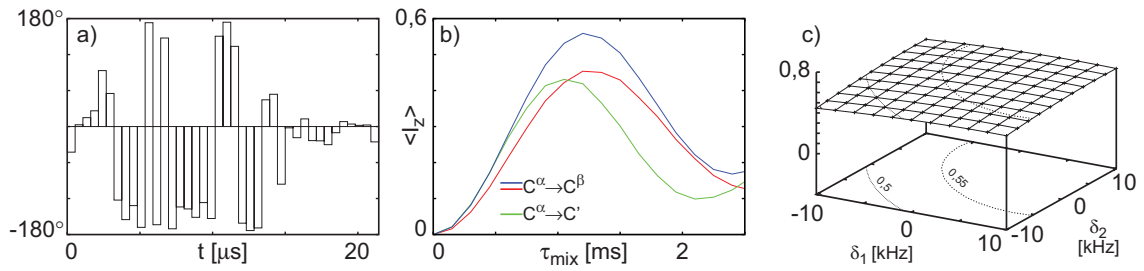
**Abb. 5.7:** 2D-TOBSY- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung von (a,b) L-Arginin und (c) L-Histidin unter Verwendung der symmetriebasierten C9 $^{15}$ -HF-Pulssequenz und dem entsprechenden numerisch optimierten C-Basiselement aus Abb. 5.5a bzw. 5.5e. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet:

(a,b) eine Drehfrequenz von 20 kHz, Mischzeiten von (a) 3 ms bzw. (b) 11,25 ms, passende  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken, 48 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 64  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 10000 Hz, eine Regenerierungszeit von 4 s und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 40 ppm.

(c) eine Drehfrequenz von 33,333 kHz, eine Mischzeit von 5,4 ms, eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärke von 120 kHz, 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 128  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 33333 Hz, eine Regenerierungszeit von 2 s und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 100 ppm.

Spektrum (c) wurde ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit generiert. Das Basiskonturlevel in (b) wurde auf den halben Wert von (a) gesetzt. Repräsentative spektrale Querschnitte an den gekennzeichneten Stellen sind gegeben.

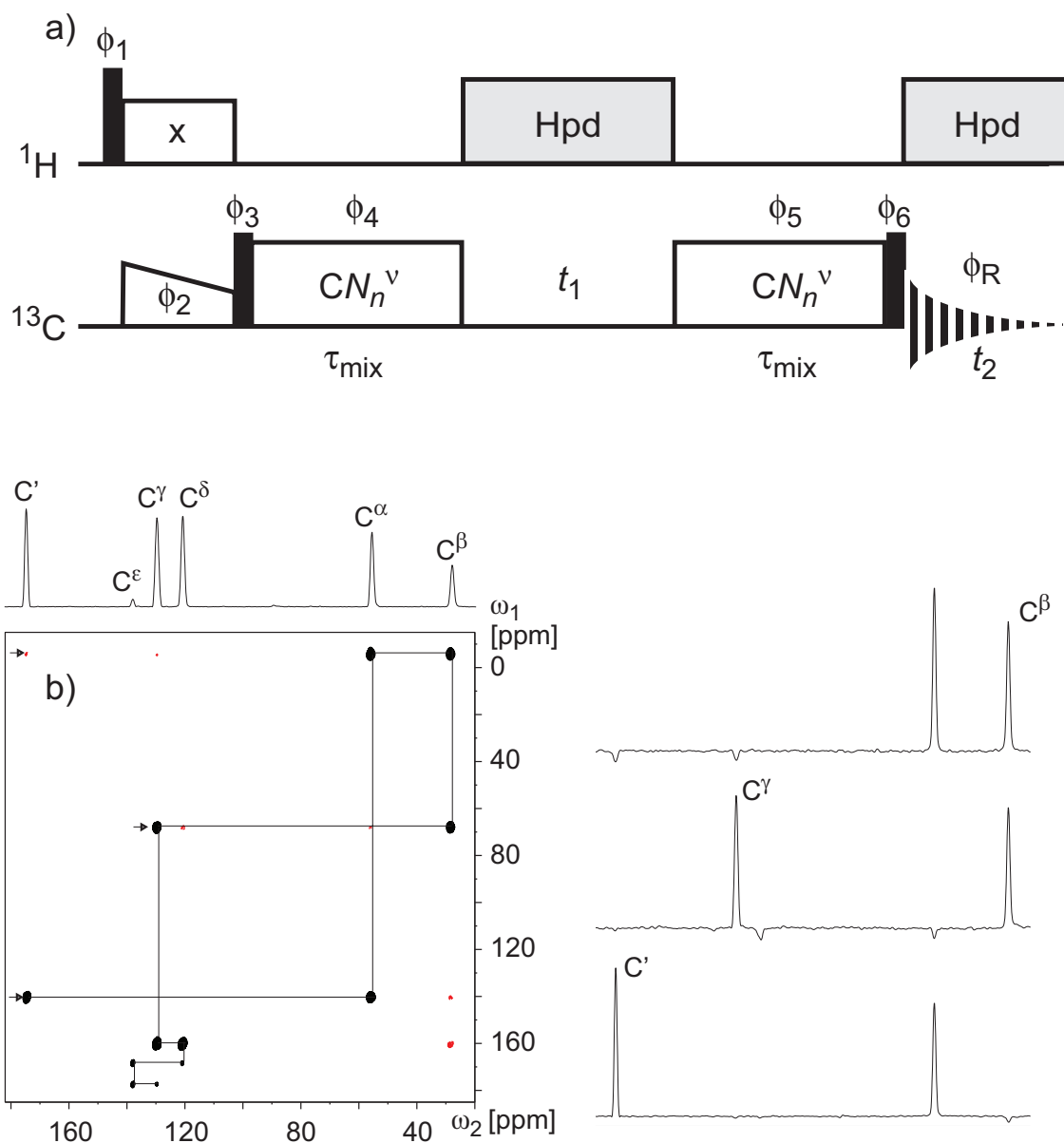




**Abb. 5.8:** Simulierte Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung der  $C7_5^1$ -Symmetrie sowie (a) das Phasenmodulationsprofil des C-Basiselements von  $21,43 \mu\text{s}$  Dauer. Die Simulationen wurden durchgeführt mit einer Drehfrequenz von  $33,333 \text{ kHz}$ , für eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von  $500 \text{ MHz}$  und einer HF-Feldstärke von  $112 \text{ kHz}$ . Die Graphen in (b) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1. Die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz wurde auf die Mitte der beiden Kohlenstoffresonanzen (Graphen in Blau) bzw. auf  $110 \text{ ppm}$  (Grün und Rot) gesetzt. Die Grafik in (c) zeigt als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne die Größe der auf Spin 2 übertragenen Magnetisierung nach  $\tau_{\text{mix}}=1,2 \text{ ms}$ , beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffs. Weitere Parameter der numerischen Simulationen entsprachen denen von Abb. 3.3. Die HF-Phasenwerte der 40 Einzelintervalle sind im Anhang gegeben.

ein C-Basiselement genutzt, welches in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge eingeteilt ist, wobei jedes Einzelintervall durch den HF-Phasenwert definiert ist. Während im vorhergehenden Kapitel das Phasenmodulationsprofil des C-Basiselements als Teilsumme einer Fourierreihe dargestellt wurde, bietet diese Methode einen alternativen Ansatz, um verschiedene Regionen des Parameterraums zu durchsuchen, um die bestmögliche Lösung zu finden. Diese ist besonders geeignet für Situationen, in denen C-Basiselemente mit relativ kurzer Länge benötigt werden. Dies ist zum Beispiel unter Verwendung symmetriebasierter Sequenzen bei hohen Drehfrequenzen der Fall. Wie man an den Ergebnissen sieht, konnten effiziente symmetriebasierte Sequenzen unter Verwendung einer geringen Anzahl unabhängiger Phasenwerte entwickelt werden. Es ist von Vorteil, die Suche nach der optimalen Lösung mit nur einer kleinen Anzahl von zu optimierenden Parametern zu starten, um die Rechenzeit zu minimieren. Nur falls damit keine zufriedenstellende Lösung erhalten werden kann, ist es notwendig, die Anzahl der zu optimierenden Parameter zu erhöhen, sei es durch Erhöhung der Anzahl der Einzelpulse oder durch Verwendung eines asymmetrischen Phasenmodulationsprofils des Basiselementes (siehe nächstes Kapitel). Obwohl nur nominale CSA-Werte und kleine Spinsysteme verwendet wurden, kann die Methode, wenn nötig, durch Änderung der Parameter, welche in der Optimierung berücksichtigt werden, an die experimentellen Gegebenheiten angepasst werden. Die Methode kann außerdem erweitert werden auf symmetriebasierte  $RN_n^V$ -Pulssequenzen, mit oder ohne gleichzeitiger  $^1\text{H}$ -Entkopplung, wie im folgenden Kapitel demonstriert wird.





**Abb. 5.9:** (a) HF-Pulssequenz zur Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -DQ-NMR-Spektren.  $90^\circ$ -Pulse sind durch gefüllte Rechtecke dargestellt. Um den gewünschten Kohärenztransferweg auszuwählen, wurden folgende Phasenzyklen für die einzelnen Pulse verwendet:  $\phi_1 = (y, -y)$ ;  $\phi_2 = y$ ;  $\phi_3 = (2^*x, 2^*-x)$ ;  $\phi_4 = x$ ;  $\phi_5 = (4^*x, 4^*y, 4^*-x, 4^*-y)$ ;  $\phi_R = (x, -x, -x, x, -y, y, y, -y, -x, x, x, -x, y, -y, -y, y)$ . Phasenempfindliche 2D-Spektren wurden durch das Erhöhen der Phasen  $\phi_2$ ,  $\phi_3$  und  $\phi_4$  um  $45^\circ$  aufgenommen [100].

(b) 2D- $^{13}\text{C}$ -DQ-NMR-Spektrum von L-Histidin, aufgenommen bei einer Rotationsfrequenz von 33,333 kHz mittels der dipolaren Rückkopplungssequenz  $\text{C7}_5^1$ . Das numerisch optimierte Basiselement aus Abb. 5.8, 2 s Regenerierungszeit, 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 256  $t_1$ -Inkremente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 33,333 kHz und eine Mischzeit  $\tau_{\text{mix}} = 450 \mu\text{s}$  wurden verwendet. Repräsentative spektrale Querschnitte an den gekennzeichneten Stellen sind ebenfalls gegeben.

## Kapitel 6

# Numerische Konstruktion symmetriebasierter $RN_n^\nu$ -Pulssequenzen

### 6.1 Einleitung

Zu jeder gegebenen MAS-Frequenz ist es möglich, verschiedene  $RN_n^\nu$ -Symmetrien zu finden, welche den gewünschten Hamiltonoperator generieren [66]. Wie schon im vorhergehenden Kapitel diskutiert, wird die Anwendbarkeit von  $RN_n^\nu$ -Pulssequenzen basierend auf konventionellen Rechteckpulsen durch die Abhängigkeit der HF-Feldstärke von der Drehfrequenz beschränkt [54]. Von Vorteil ist deswegen die Verwendung von phasen- und/oder amplitudenmodulierten Basiselementen, welche maßgeschneidert auf die Symmetrie und die experimentellen Anforderungen oder Beschränkungen sind. Dies sind zum Beispiel die zur Verfügung stehende HF-Feldstärke, die MAS-Frequenz und die Resonanzoffsetbereiche der betrachteten Kerne. Der Erfolg solch einer Vorgehensweise konnte schon im vorhergehenden Kapitel anhand der Konstruktion von symmetriebasierten  $CN_n^\nu$ -Sequenzen gezeigt werden. Fortführend wurde nun die numerische Generierung von effizienten symmetriebasierten  $RN_n^\nu$ -Sequenzen für dipolare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkopplung sowie für TOBSY-Sequenzen untersucht.

### 6.2 Numerische und experimentelle Methoden

Wie auch im vorhergehenden Kapitel wurden symmetriebasierte  $RN_n^\nu$ -Pulssequenzen für dipolares  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkoppeln unter gleichzeitiger Einstrahlung von  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit implementiert. Dagegen wurden TOBSY-Sequenzen ohne gleichzeitige  $^1\text{H}$ -Entkopplung generiert, um Interferenzen zwischen  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -HF-Feldern vollständig zu eliminieren. Phasenmodulierte Universalrotationspulse mit konstanter Amplitude und geeigneten Längen, abhängig von der MAS-Frequenz und

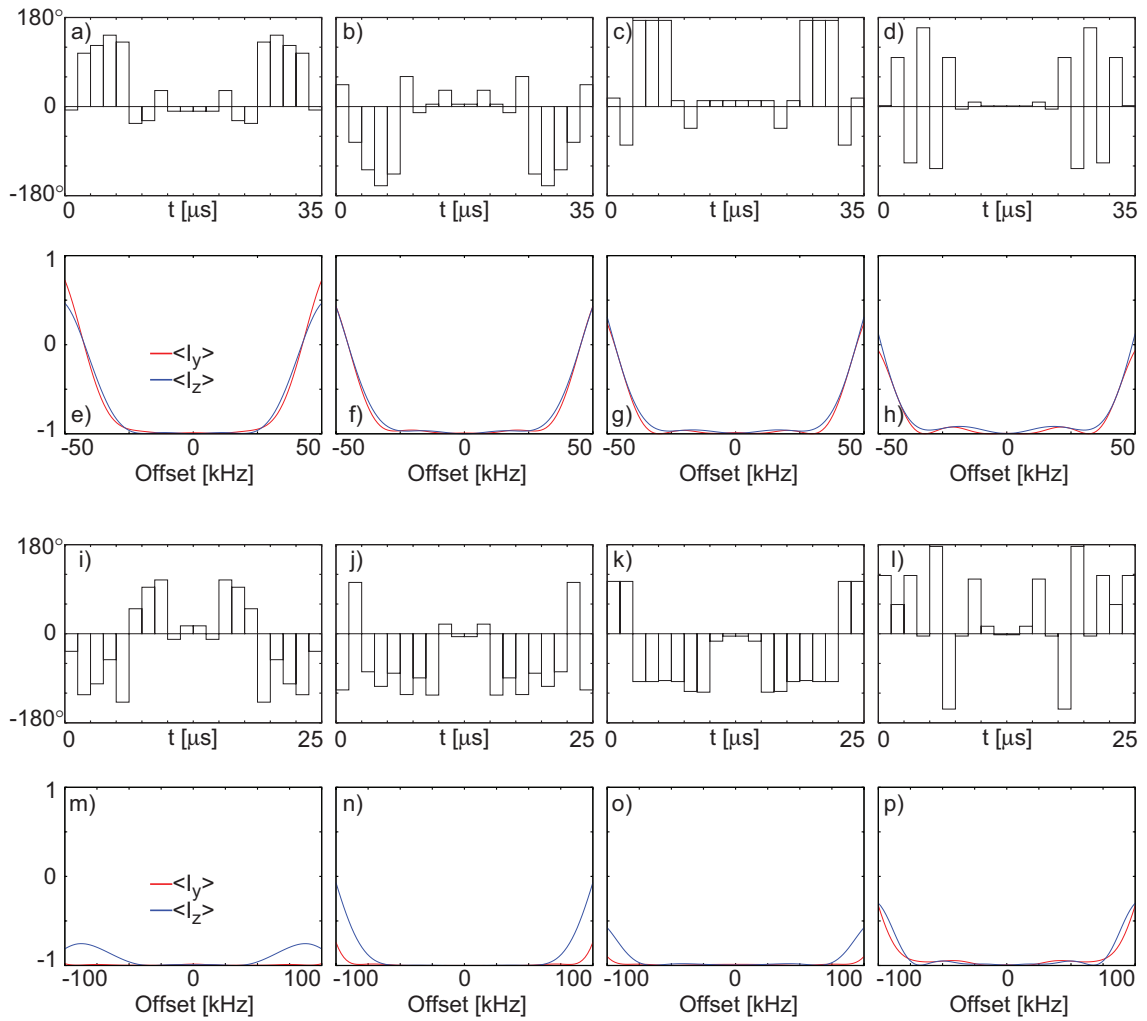
der Wahl der Pulssequenz, wurden zuerst unter Berücksichtigung eines  $\text{Spin-}\frac{1}{2}$ -Systems generiert. Die globale Optimierungsmethode GA wurde dabei genutzt, um den Entwicklungsoperator  $\exp(i\pi I_x)$  über den gewünschten Resonanzoffsetbereich zu erhalten. Die Pulse wurden in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge eingeteilt. Die HF-Feldstärken lagen entweder im Bereich von 40-50 kHz oder 100-120 kHz, je nachdem, ob die Pulse für symmetriebasierte Sequenzen mit oder ohne gleichzeitige Entkopplung genutzt werden sollten.  $180^\circ$ -Pulse wurden konstruiert, so dass das Phasenmodulationsprofil symmetrisch bezüglich der Mitte des Pulses ist. Diese Pulse dienten als Start-*R*-Basiselement für die weitere numerische Optimierung. Falls notwendig, wurde auch das Phasenmodulationsprofil des *R*-Basiselements nicht mehr auf ein zur Mitte des Pulses symmetrisches Profil beschränkt. Im Allgemeinen wurde ein weiterer finaler Optimierungsschritt mit einer größeren Zahl von 84 Kristallorientierungen durchgeführt. Die Rechnungen wurden auf einer Vielzahl von Computersystemen, einschließlich eines UNIX-Clusters mit 64 Prozessoren, ausgeführt.

Als stellvertretende Beispiele wurden die symmetriebasierten Sequenzen  $R18_{16}^{-8}$ ,  $R18_{16}^1$ ,  $R18_{14}^2$ ,  $R16_{14}^1$ ,  $R16_{14}^{-7}$ ,  $R14_{12}^{-6}$ ,  $R14_{12}^1$ ,  $R20_{18}^1$  und  $R20_{18}^{-9}$  [54] für eine Drehfrequenz von 25 kHz untersucht, um  $\gamma$ -kodierte, dipolare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkopplung zu erreichen. Die  $R32_{28}^3$ -Symmetrie [92] wurde genutzt, um TOBSY-Sequenzen für Drehfrequenzen von 33,333 kHz und 25 kHz zu generieren. In den numerischen Rechnungen wurde ein  $^{13}\text{C}1$ - $^{13}\text{C}2$ - bzw.  $^1\text{H}1$ - $^{13}\text{C}1$ - $^{13}\text{C}2$ - $^1\text{H}2$ -Spinsystem betrachtet, je nachdem, ob die Sequenz mit bzw. ohne gleichzeitige  $^1\text{H}$ -Entkopplung eingestrahlt wird. Dementsprechend wurde auch der Resonanzoffsetbereich der dipolar gekoppelten Kohlenstoff-Spins auf  $\pm 10$  bzw.  $\pm 15$  kHz gesetzt. Weitere Details der Optimierung entsprachen denen aus dem vorhergehenden Kapitel.

Alle Spektren wurden mit L-Histidin- sowie L-Arginin-Proben erzeugt. Die Luftkühlung wurde bei einer Temperatur von  $\approx -50^\circ\text{C}$  gehalten, was einer Probentemperatur von ca.  $0^\circ\text{C}$  bei einer Drehfrequenz von 33,333 kHz entspricht.

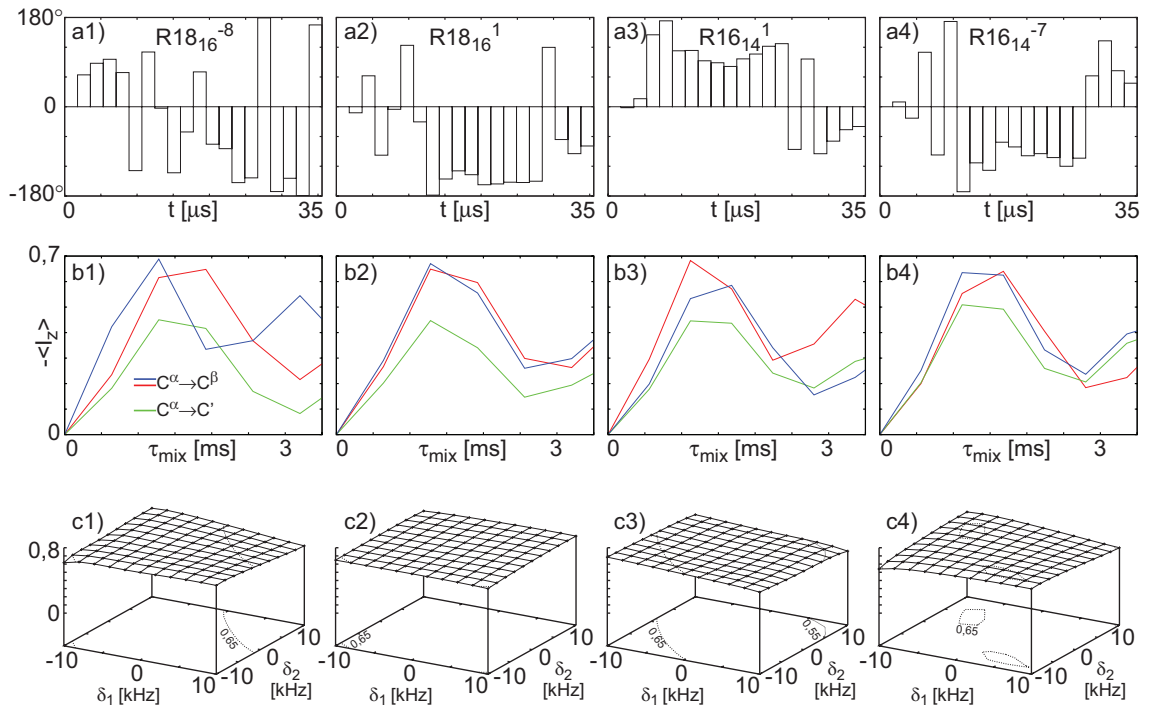
### 6.3 Ergebnisse und Diskussion

Abb. 6.1 zeigt die Phasenmodulationsprofile und die Leistungscharakteristika einiger mittels GA generierter Universalrotationspulse. Die graphischen Darstellungen in Abb. 6.1a-h entsprechen  $180^\circ$ -Pulsen von  $35\ \mu\text{s}$  Länge, welche für eine HF-Feldstärke von 50 kHz und 20 Einzelintervallen erstellt wurden. In Abb. 6.1i-p sieht man  $180^\circ$ -Pulse von  $25\ \mu\text{s}$  Länge, diese wurden für eine HF-Feldstärke von 120 kHz und 20 Einzel-



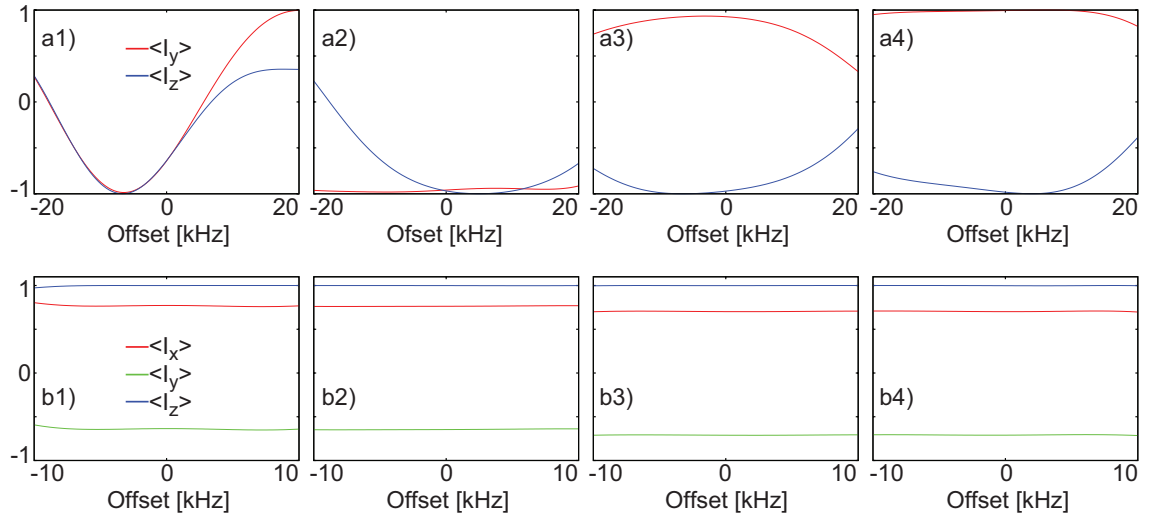
**Abb. 6.1:** (a-d) Phasenprofile der Universalrotationspulse von 35  $\mu\text{s}$  Länge, eingeteilt in 20 Einzelintervalle konstanter Amplitude und gleicher Länge, generiert unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 50 kHz und Bandbreiten von (a) 40 kHz, (b) 50 kHz, (c) 60 kHz, (d) 70 kHz. In (e-h) ist die resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse, beginnend mit  $\langle I_y \rangle$ - und  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, unter Berücksichtigung eines Spin- $\frac{1}{2}$ -Systems, zu sehen. Die Graphen (i-l) stellen die HF-Phasenmodulationsprofile von 180°-Pulsen mit konstanter Amplitude und 25  $\mu\text{s}$  Länge dar, eingeteilt in 20 Einzelintervalle unter Berücksichtigung einer HF-Feldstärke von 120 kHz und Bandbreiten von (i) 80 kHz, (j) 100 kHz, (k) 120 kHz, (l) 140 kHz. Die Abbildungen (m-p) zeigen die entsprechende resultierende Magnetisierung nach Einstrahlung dieser Pulse, beginnend mit  $\langle I_y \rangle$ - und  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung. Die HF-Phasenwerte der ersten 10 Einzelintervalle sind im Anhang gegeben

intervallen generiert. Weitere Parameter können den Bilduntertiteln entnommen werden. Mittels eines Mac Pro war es möglich, solche Pulse in einer sehr kurzen Zeit (<15 min) zu optimieren. Die Leistung dieser Pulse wird dabei, wie erwartet, nur unerheblich durch geringe Variationen der HF-Feldstärke gestört (Daten nicht gezeigt). Auch hier sind die phasenmodulierten Pulse wie konventionelle Pulse skalierbar. Ausgehend von verschiedenen mittels GA generierten R-Elementen wurde eine große Zahl numerischer Optimierungsläufe durchgeführt, um zufriedenstellende Leistung der gewählten symmetriebasierten Sequenz zu erreichen. Dabei betrug die Rechenzeit unter Verwen-



**Abb. 6.2:** Optimierte R-Elemente und die dazugehörigen Charakteristika der Magnetisierungsübertragung der DQ-Rückkopplungssequenzen (a1-e1)  $R18_{16}^{-8}$ , (a2-e2)  $R18_{16}^1$ , (a3-e3)  $R16_{14}^1$ , und (a4-e4)  $R16_{14}^{-7}$  für eine MAS-Frequenz von 25 kHz, unter Verwendung von HF-Feldstärken von 44, 49, 50 bzw. 50 kHz. In (a1-a4) sind die Phasenmodulationsprofile der numerisch optimierten R-Elemente abgebildet. Die Kurven (b1-b4) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1, in Abhängigkeit von der Mischzeit. Diese wurden unter Verwendung von Parametern für ein Alanin- bzw. Glyzin-Spinsystem wie in Abb. 3.3 generiert, wobei die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz entweder auf die Mitte der beiden Kohlenstoffresonanzen (blau) oder auf 110 ppm (grün und rot) gesetzt wurde. Die Graphen in (c1-c4) zeigen als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne die Größe der auf  $^{13}\text{C}^\beta$  übertragenen Magnetisierung bei  $\tau_{\text{mix}} \approx 1,2$  ms, beginnend mit z-Magnetisierung auf  $^{13}\text{C}^\alpha$ . Die HF-Phasenwerte der 20 Einzelintervalle der R-Basiselemente sind im Anhang gegeben.

dung eines Mac Pro mit vier Prozessoren nur wenige Stunden (<1 h bzw. <3 h für Optimierungsrechnungen mit bzw. ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung). Die simulierten Leistungscharakteristika einiger der numerisch optimierten  $RN_n^v$ -Symmetrien sind in Abb. 6.2 dargestellt, zusammen mit dem dazugehörigen Phasenmodulationsprofil (Abb. 6.2a1-a4) des R-Basiselementes. Abb. 6.2b1-b4 zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff-Spin übertragenen Magnetisierung in Abhängigkeit von der Mischzeit. Obwohl die Basiselemente für ein  $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}^\beta$ -Alanin-Spinsystem generiert wurden, ist auch hier eine zufriedenstellende Leistung für  $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}'$ -Glyzin-Spinsysteme, in denen ein Kohlenstoff eine große CSA besitzt, ersichtlich. Die Darstellungen in Abb. 6.2c1-c4 zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Spin 2 bei  $\tau_{\text{mix}} = 1,2$  ms, beginnend mit z-Magnetisierung des ersten Kohlenstoffspins, als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne. Man sieht, dass zufriedenstellende DQ-Rückkopplung über eine große Bandbreite mit moderaten  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken von 50 kHz oder weniger, so-

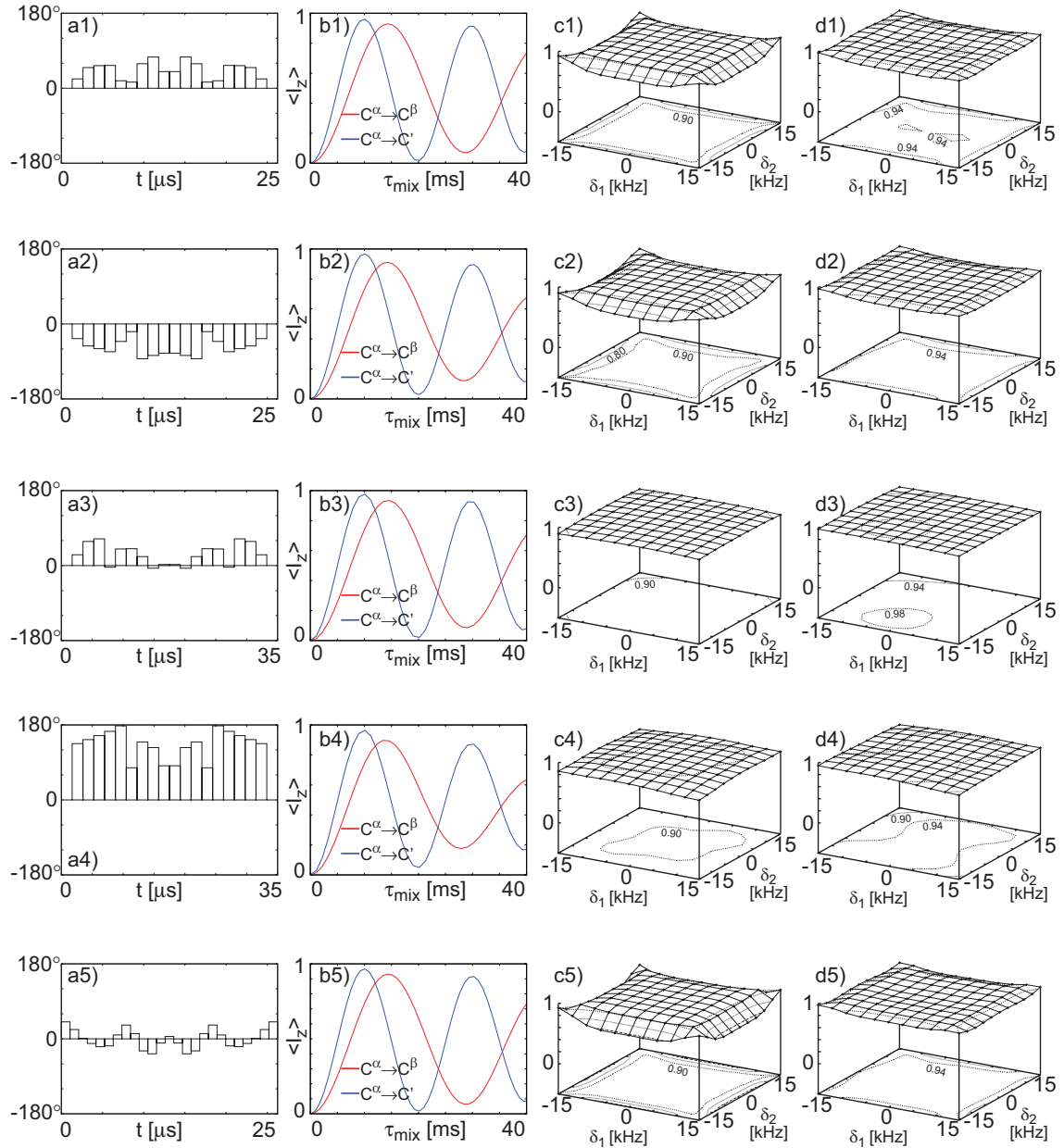


**Abb. 6.3:** Abb. (a1-a4) zeigen die Inversionsprofile nach Einstrahlung der verschiedenen  $R$ -Elemente aus Abb. 6.2a1-a4, beginnend mit  $\langle I_z \rangle$ - sowie  $\langle I_y \rangle$ -Magnetisierung, unter Berücksichtigung eines  $\text{Spin-}\frac{1}{2}$ -Systems. In (b1-b4) ist die nach Einstrahlung des Pulspaares  $R_\phi R_{-\phi}$  beobachtete  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, beginnend mit  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, abgebildet (blau). Weiterhin ist auch die beobachtete  $\langle I_x \rangle$ - bzw.  $\langle I_y \rangle$ -Magnetisierung beginnend mit  $\langle I_x \rangle$ - bzw.  $\langle I_y \rangle$ -Magnetisierung gegeben (rot bzw. grün). Die HF-Phasenwerte der 20 Einzelintervalle der  $R$ -Basiselemente sind im Anhang gegeben.

gar bei hohen MAS-Frequenzen, auch mittels symmetriebasierter  $RN_n^V$ -Pulssequenzen möglich ist. Erwähnenswert ist auch, dass eine zufriedenstellende DQ-Rückkopplung nicht erreichbar war, solange das Phasenmodulationsprofil des  $R$ -Basiselementes darauf beschränkt war, symmetrisch bezüglich des Pulsmittelpunktes zu sein. Deswegen wurde diese Einschränkung in der lokalen Optimierung aufgehoben. Im Vergleich mit konventionellen  $R$ -Elementen des Typs  $\{(\pi/2)_0(3\pi/2)_\pi\}$ ,  $(\pi)_0$  und  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)_\pi(\pi/3)_0\}$  [54] sind die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung von optimierten  $R$ -Elementen deutlich besser (Daten nicht gezeigt). Anhand der simulierten Inversionsprofile der numerisch optimierten  $R$ -Elemente (Abb. 6.3a1-a4) ist auch zu sehen, dass diese nicht zur Klasse der Universalrotationspulse gehören, welche eine Rotation der Magnetisierung um  $180^\circ$  um die  $x$ -Achse bewirken sollten. Nichtsdestotrotz ist aus Abb. 6.3b1-b4 ersichtlich, dass der Entwicklungsoperator des Pulspaares  $R_\phi R_{-\phi}$  dem Term  $\exp(-i4\phi I_z)$  im berücksichtigten Resonanzoffsetbereich entspricht, also einer Rotation um die  $z$ -Achse um den Winkel  $4\phi$ . Solch eine Rotation hat keine Auswirkung auf die  $\langle I_z \rangle$ -Magnetisierung, bewirkt aber eine Rotation der transversalen Magnetisierung. Beginnend mit  $\langle I_x \rangle$ -Magnetisierung führt die Einstrahlung des Pulspaares zum Beispiel fuer die  $R18_{16}^{-8}$ - bzw.  $R18_{16}^1$ -Sequenz mit  $\phi = 10^\circ$  zu einem Zustand der Magnetisierung von  $\langle I_x \rangle = \cos(4\phi) = 0,77$  und  $\langle I_y \rangle = -\sin(4\phi) = -0,64$ . Offensichtlich ist es also nicht notwendig, die  $R$ -Basiselemente auf Universalrotationspulse zu beschränken, solange das Pulspaar  $R_\phi R_{-\phi}$  einen Entwicklungsoperator  $U = \exp(-i4\phi I_z)$  erzeugt.

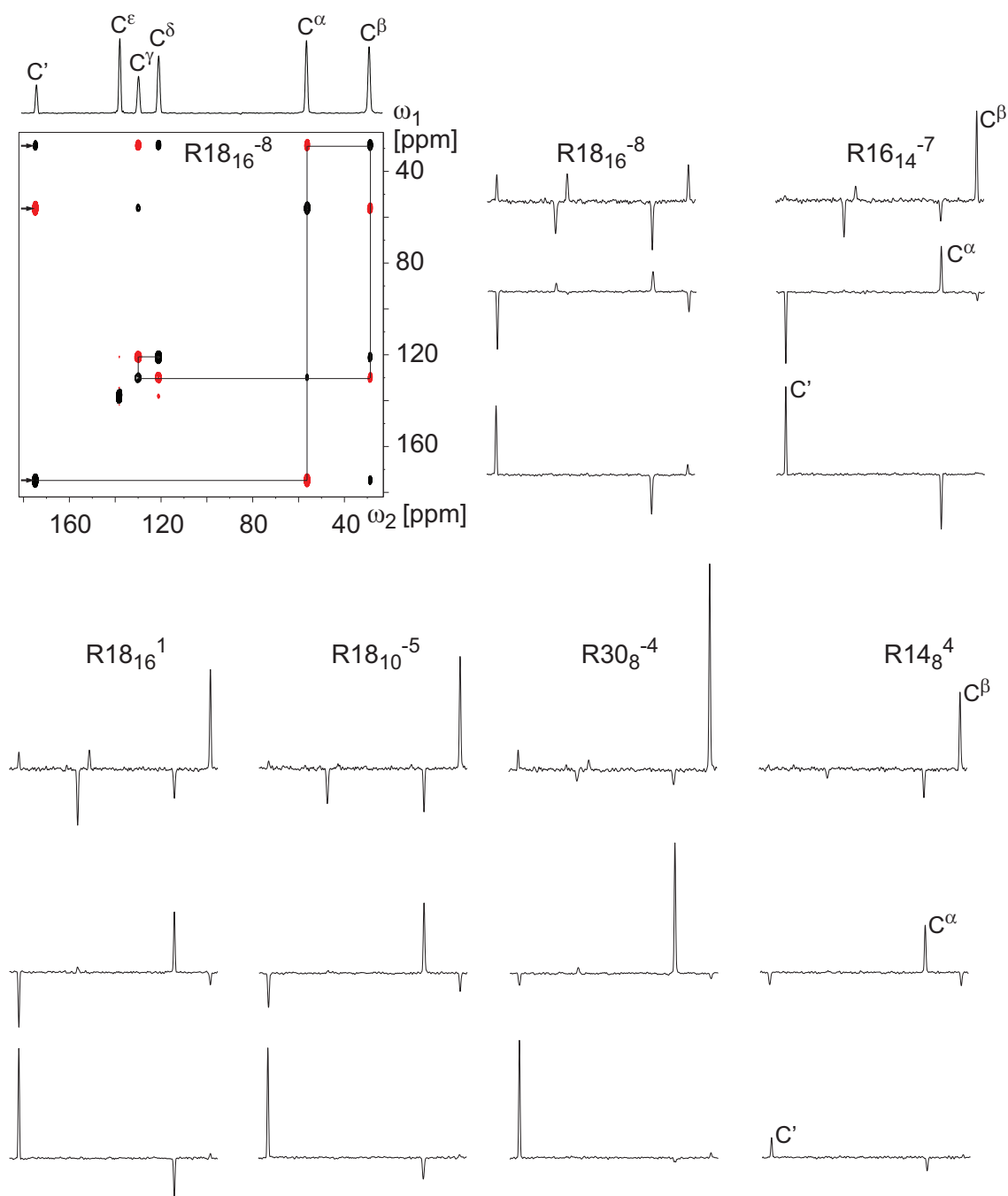
Abb. 6.4 zeigt die Charakteristika der TOBSY-Magnetisierungsübertragung bei Einstrahlung der symmetriebasierten  $R32_{28}^3$ -Sequenz mit den dazugehörigen optimierten  $R$ -Elementen (Abb. 6.4a1-a5). Diese wurden ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit und mit einer Drehfrequenz von 33,333 kHz (Abb. 6.4a1-d1, a2-d2, a5-d5) bzw. 25 kHz (Abb. 6.4a3-d3, a4-d4) generiert. Für die Darstellung der Magnetisierungsübertragung (Abb. 6.4b1-b5) wurde die  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz auf 110 ppm gesetzt. Die 3D-Graphen (Abb. 6.4c1-c5, d1-d5) zeigen die Charakteristika der Magnetisierungsübertragung als Funktion der Resonanzoffsets der zwei dipolar gekoppelten Kohlenstoffkerne. Auch hier sieht man, dass zufriedenstellende Leistung auch im Fall der  $^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}'$ -Magnetisierungsübertragung erreicht wird, obwohl die optimierten Basiselemente mittels Parameter eines Alanin-Spinsystems generiert wurden. Somit ist aus den Simulationen ersichtlich, dass effiziente symmetriebasierte  $RN_n^\nu$ -Sequenzen mittels  $R$ -Elementen, welche in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge eingeteilt sind, erstellbar sind. Falls diese Methode zuviel Rechenzeit benötigt oder einfach nicht zu einer zufriedenstellenden Lösung führt, kann auf die Darstellung der Phasenmodulationsprofile der  $R$ -Elemente als Teilsumme einer Fourierreihe ausgewichen werden (siehe Kap. 4). Als Beispiel zeigen Abb. 6.4b5-d5 Leistungscharakteristika der symmetriebasierten  $R32_{28}^3$ -Sequenz für eine Drehfrequenz von 33,333 kHz unter Verwendung eines mittels der Fourier-Methode generierten  $R$ -Elements (Abb. 6.4a5). Wie im Falle der DQ-Rückkopplung gehören auch die optimierten TOBSY- $R$ -Elemente nicht zur Klasse der Universalrotationspulse (Daten nicht gezeigt). Festzuhalten ist auch, dass die allgemeine Leistung der symmetriebasierten  $R32_{28}^3$ -Sequenz mit numerisch optimierten  $R$ -Elementen deutlich besser ist als unter Verwendung adiabatischer tanh/tan-Pulse (siehe Kap. 3).

Die Wirksamkeit der hier beschriebenen symmetriebasierten Sequenzen wurde auch mittels experimenteller Messungen untersucht. Die  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren einer polykristallinen L-Histidin-Probe sind in Abb. 6.5 zusammen mit einigen spektralen Querschnitten abgebildet. Generiert wurde das Spektrum mittels der  $R18_{16}^{-8}$ -Symmetrie. Analoge Spektren wurden unter Benutzung weiterer hier generierter Basiselemente aufgenommen und Querschnitte aus diesen Spektren sind ebenfalls in Abb. 6.5 gezeigt. Zum Vergleich sind auch 2D- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung unter Verwendung der  $R$ -Basiselemente  $(\pi)_0$  und  $\{(\pi/2)_0(3\pi/2)_\pi\}$  erstellt worden. Hierfür waren HF-Feldstärken im Bereich von 40-50 kHz nötig. Die dazugehörigen spektralen Querschnitte sind in Abb. 6.5 zu sehen. Aufgrund der höheren Intensitäten der Kreuzsignale ist ersichtlich, dass die DQ-Rückkopplungsleistung der  $RN_n^\nu$ -

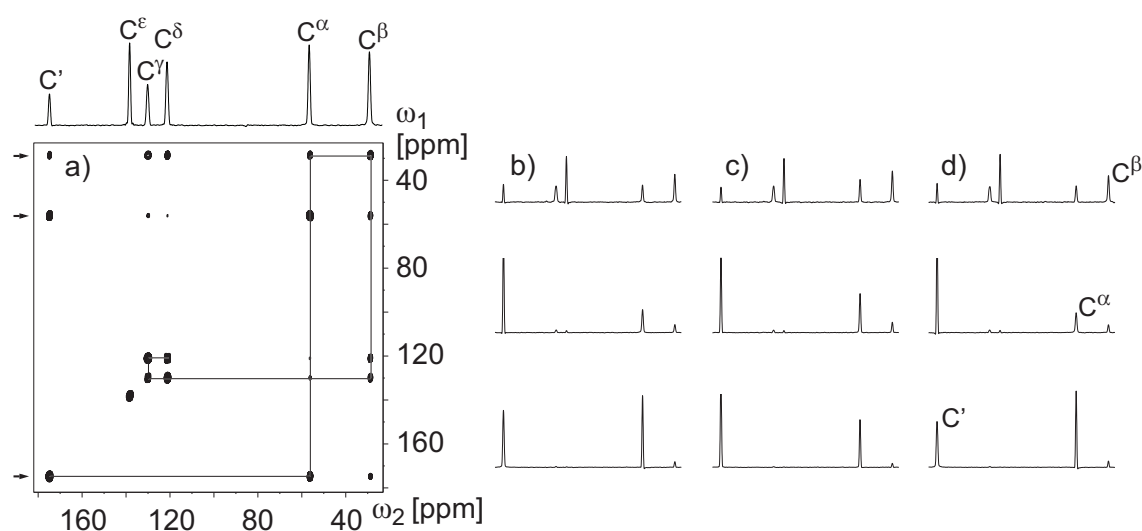


**Abb. 6.4:** Phasenmodulationsprofile der optimierten R-Elemente mit Längen von (a1, a2, a5) 26,25  $\mu$ s und (a3, a4) 35  $\mu$ s und den dazugehörigen simulierten Charakteristika der longitudinalen Magnetisierungsübertragung, unter Verwendung der symmetriebasierten R32<sub>28</sub>-HF-Pulssequenz bei Drehfrequenzen von (a1-d1, a2-d2, a5-d5) 33,333 kHz und (a3-d3, a4-d4) 25 kHz ohne <sup>1</sup>H-Entkopplung während der Mischzeit. Die simulierten Darstellungen in (b1-b5) zeigen die Größe der auf den zweiten Kohlenstoff (<sup>13</sup>C<sup>β</sup>/<sup>13</sup>C') übertragenen Magnetisierung, normiert auf das maximal übertragbare Signal, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoff 1 (<sup>13</sup>C<sup>α</sup>). Diese Simulationen wurden durchgeführt mit einer <sup>13</sup>C-HF-Trägerfrequenz von 110 ppm und HF-Feldstärken von (b1, b2, b5) 114 kHz, (b3) 120 kHz und (b4) 100 kHz. Die Grafiken (c1-c5) und (d1-d5) zeigen die Größe der <sup>13</sup>C<sup>α</sup> → <sup>13</sup>C<sup>β</sup> bzw. <sup>13</sup>C<sup>α</sup> → <sup>13</sup>C' Magnetisierungsübertragung als Funktion der Resonanzoffsets der skalar gekoppelten Kerne bei (c1-c5)  $\tau_{mix} \approx 14$  bzw. (d1-d5) 9,5 ms. Weitere Parameter der numerischen Simulationen entsprachen denen von Abb. 3.3. Das Phasenmodulationsprofil des R-Elements (a5) wurde als Teilsumme einer Kosinus-Fourierreihe dargestellt (siehe Kap. 4). Dieser Puls wurde in 25 Einzelintervalle gleicher Länge eingeteilt. Die HF-Phasenwerte bzw. Fourierkoeffizienten der optimierten Pulse sind im Anhang gegeben.





**Abb. 6.5:** 2D- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum der chemischen Verschiebung von L-Histidin generiert mittels longitudinaler Magnetisierungsübertragung mit der dipolaren DQ-Rückkopplungssequenz  $\text{R18}_{16}^{-8}$  und dem entsprechenden numerisch optimierten R-Basiselement aus Abb. 6.2a1. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von 25 kHz, eine Mischzeit von 1,28 ms, eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärke von 44 kHz, 32 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 64  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 25000 Hz, eine Regenerierungszeit von 2 s und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 100 ppm. Zum Vergleich sind repräsentative Querschnitte aus Spektren unter Benutzung anderer Symmetrien gegeben. Die unter Verwendung der  $\text{R16}_{14}^{-7}$  und  $\text{R18}_{16}^1$ -Symmetrien generierten Daten wurden mit den entsprechenden optimierten R-Elemente aus Abb. 6.2 erhalten, mit Mischzeiten von 1,12 ms bzw. 1,28 ms und HF-Feldstärken von 50 bzw. 49 kHz. Zur Generierung der Spektren unter Verwendung der  $\text{R18}_{10}^{-5}$ -,  $\text{R30}_8^{-4}$ - und  $\text{R14}_8^4$ -Symmetrien wurden die R-Elemente  $\{(\pi/2)_0(3\pi/2)_\pi\}$ ,  $(\pi)_0$  bzw.  $\{(\pi/2)_0(3\pi/2)_\pi\}$  eingesetzt. Mischzeiten von 1,2; 1,28 bzw. 1,28 ms und HF-Feldstärken von 45, 47 bzw. 44 kHz wurden dafür benutzt. Die  $^{13}\text{C}^\beta$ -Querschnitte wurden auf die doppelte Höhe der  $^{13}\text{C}^\alpha$  und  $^{13}\text{C}'$ -Querschnitte skaliert.



**Abb. 6.6:** (a) 2D-TOBSY- $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung von L-Histidin, generiert mit der symmetriebasierten  $\text{R}32_{28}^3$ -Pulssequenz und dem entsprechenden numerisch optimierten R-Basiselement aus Abb. 6.4a1. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet: eine Drehfrequenz von 33,333 kHz, eine Mischzeit von 5,88 ms, eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärke von 114 kHz ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit, 16 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 128  $t_1$ -Inkmente, eine  $\omega_1$ -Spektralbreite von 33333 Hz, eine Regenerierungszeit von 2 s und eine  $^{13}\text{C}$ -HF-Trägerfrequenz von 40 ppm. Repräsentative Querschnitte aus diesem Spektrum und mittels anderen R-Elementen generierten Spektren sind auch gegeben. Die Spektren in (b, c, d) wurden unter Verwendung der R-Elemente aus Abb. 6.4a1, a2 bzw. a5 generiert. Die  $^{13}\text{C}^\beta$ -Querschnitte wurden auf die doppelte Höhe der  $^{13}\text{C}^\alpha$ - und  $^{13}\text{C}'$ -Querschnitte skaliert.

Symmetrien unter Verwendung numerisch optimierter R-Elemente deutlich besser ist. Das TOBSY-Spektrum in Abb. 6.6a wurde generiert mit der  $\text{R}32_{28}^3$ -Sequenz ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit. Das numerisch optimierte Basiselement aus Abb. 6.4a1 und eine Drehfrequenz von 33,333 kHz wurden verwendet. Unter Benutzung weiterer numerisch optimierter Basiselemente (Abb. 6.4) wurden analoge Spektren aufgenommen. Zum Vergleich sind ebenso einige repräsentative Querschnitte dieser Spektren zu sehen. Die Kreuzsignalintensitäten aller Spektren sind vergleichbar mit den Resultaten aus dem vorhergehenden Kapitel.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die numerische Konstruktion effizienter Mischsequenzen auch auf symmetriebasierte  $\text{RN}_n^V$ -TOBSY und DQ-Rückkopplungssequenzen angewandt werden kann. Durch Einteilung des Phasenmodulationsprofils des R-Basiselementes in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge konnte die Anzahl der zu optimierenden Variablen eingeschränkt werden. Bemerkenswert ist, dass eine zufriedenstellende Wirksamkeit der numerisch optimierten Pulssequenzen nicht möglich war, solange das Phasenmodulationsprofil des R-Basiselementes darauf beschränkt war, symmetrisch bezüglich des Pulsmittelpunktes zu sein. Dies ermöglichte dann die Erzeugung effizienter Pulssequenzen unter Berücksichtigung experimenteller Anforderungen und Einschränkungen.

## Kapitel 7

# Dipolare $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Rückkopplung mittels symmetriebasierter HF-Pulssequenzen bei hohen MAS-Frequenzen

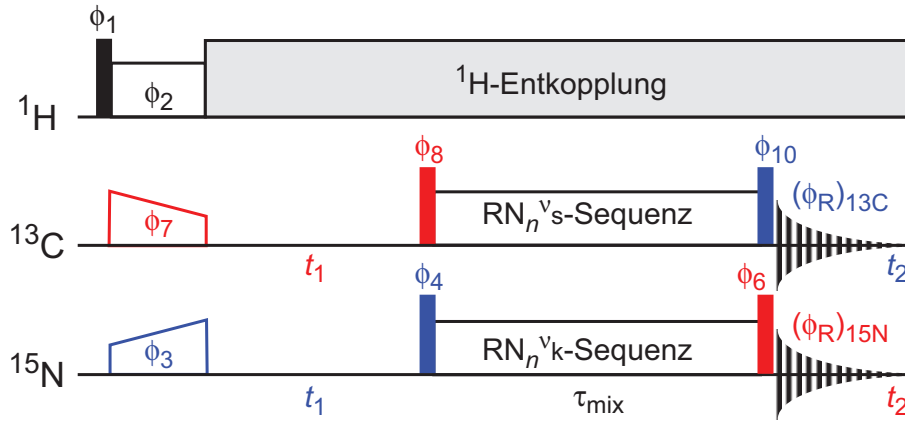
### 7.1 Einleitung

Mischsequenzen, welche zu homo- und heteronuklearem Kohärenztransfer über dipolare Kopplungen führen, stellen einen wichtigen Baustein für Festkörper-NMR-Studien an biologischen Systemen dar. So werden zum Beispiel  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimente für die Zuordnung von  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen in Peptiden, Proteinen und RNA genutzt [17; 22; 27; 33; 42; 48; 78; 89; 93; 97; 99; 101]. Kürzlich wurde auch gezeigt, dass Proton-Zuordnungen in Proteinen mittels  $^{13}\text{C}^{\alpha}$ - $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}'$ - $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}^{\alpha}$ - $^1\text{H}$ -Experimenten unter direkter Protondetektion bei hohen MAS-Geschwindigkeiten erreicht werden können [113]. Weiterführend konnten 3D- $^{13}\text{C}'$ - $^{15}\text{N}$ -( $^1\text{H}$ )- $^1\text{H}$ -Experimente für  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Distanzmessungen genutzt werden. Gekoppelt mit Torsionswinkeln, welche aus isotropen chemischen Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne gewonnen wurden, erhielt man eine hochaufgelöste Struktur der  $\beta$ 1-Immunoglobulin-bindenden Domäne des Proteins G (GB1) [114]. Weiterhin erlauben Experimente basierend auf  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Doppelquanten-Kohärenzen die Ermittlung der Torsionswinkel in Proteinen [41]. Hierbei entwickelt sich diese Kohärenz entweder unter dem Einfluss der CSA oder der heteronuklearen Kopplungen direkt gebundener Protonen. Diese Experimente haben gemein, dass sie dipolare  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Wechselwirkungen rückkoppeln, was zum Beispiel durch symmetriebasierte Zweikanal-Sequenzen erreicht werden kann. Brinkmann und Levitt haben mit einer kombinatorischen Vorgehensweise gezeigt, dass die Symmetrien  $\text{R22}_7^{9,6}$ ,  $\text{R24}_9^{8,7}$  und  $\text{R24}_9^{-5,-10}$  mit den Basiselementen  $\{(\pi/2)_\pi(2\pi)_0(\pi)_\pi(\pi/2)_0\}^{s,k}$ ,

$\{(\pi/2)_\pi(2\pi)_0(\pi)_\pi(\pi/2)_0\}^{s,k}$  bzw.  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)_\pi(\pi/3)_0\}^{s,k}$  für  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkopplung genutzt werden können [15]. Da diese aber nicht notwendigerweise die besten Lösungen für heteronukleare dipolare Rückkopplung darstellen, wurde die in den vorhergehenden Kapiteln besprochene numerische Optimierungsmethode auch auf dieses Problem angewandt. Die Effizienz dieser Methode zur Entwicklung von breitbandigen symmetriebasierten  $\text{RN}_n^{\nu_s, \nu_k}$ -Pulssequenzen, welche  $\gamma$ -kodierte dipolare  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -DQ-Rückkopplung ermöglichen, ist hier mittels numerischer Simulationen und experimenteller Messungen dargelegt. Unter Verwendung dieser Pulssequenzen und mehrerer Empfänger wird auch die Möglichkeit aufgezeigt, 3D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -( $^1\text{H}$ )- $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren gleichzeitig aufzunehmen.

## 7.2 Numerische und experimentelle Methoden

In diesem Kapitel wurden phasenmodulierte Universalrotationspulse konstanter Amplitude als  $R$ -Basiselement verwendet. Diese wurden mittels der globalen Optimierungsmethode GA, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, konstruiert. Die Pulse wurden in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge eingeteilt und eine HF-Feldstärke im Bereich von 15-45 kHz und Inversionsbandbreiten von 8-20 kHz berücksichtigt. Weiterhin wurde ein Phasenmodulationsprofil verwendet, welches symmetrisch bezüglich der Mitte des Pulses ist. Zusätzlich zu den von Brinkmann und Levitt veröffentlichten  $\text{RN}_n^{\nu_s, \nu_k}$ -Pulssequenzen mit  $N \leq 24$ ,  $n \leq 9$  und  $N/n \leq 7$  für  $\gamma$ -kodierte heteronukleare DQ-Rückkopplung wurden auch weitere Sequenzen mit  $N \leq 24$  und  $n > 9$  auf Grundlage der Auswahlregeln für Zweikanal-Pulssequenzen ermittelt (siehe Tab. C.1), wobei die gleichen symmetrieerlaubten Terme  $(m, \mu_s, \mu_k) = \{(1, -1, -1), (-1, 1, 1)\}$  ausgewählt wurden [15]. Wie bisher wurde das Phasenmodulationsprofil der Basiselemente mittels der in SPINEVOLUTION [107] integrierten lokalen Optimierungsprozedur NL2SOL unter Berücksichtigung eines  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Spinsystems weiter numerisch optimiert. Zu beachten ist, dass es nun nötig war, zwei Basiselemente gleichzeitig zu optimieren, je eins für den  $^{13}\text{C}$ - sowie für den  $^{15}\text{N}$ -Kanal. In einem System von gebundenen  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen ist eine Magnetisierungsübertragung in ca. 2-3 ms möglich. Deshalb wurde die Größe der longitudinalen Magnetisierung, welche auf den  $^{15}\text{N}$ -Spin übertragen wurde, bei einer Mischzeit von  $\approx 2$  ms maximiert. Ein Resonanzoffsetbereich von  $\pm 5$  kHz für  $^{13}\text{C}$  und entweder  $\pm 5$  kHz oder  $\pm 1$  kHz für  $^{15}\text{N}$  und typische Parameter für chemische Verschiebungen und dipolare Kopplungen wurden für die zwei dipolar gekoppelten Kerne verwendet (siehe Bildunterschrift in Abb. 7.3). In der lokalen Optimierung



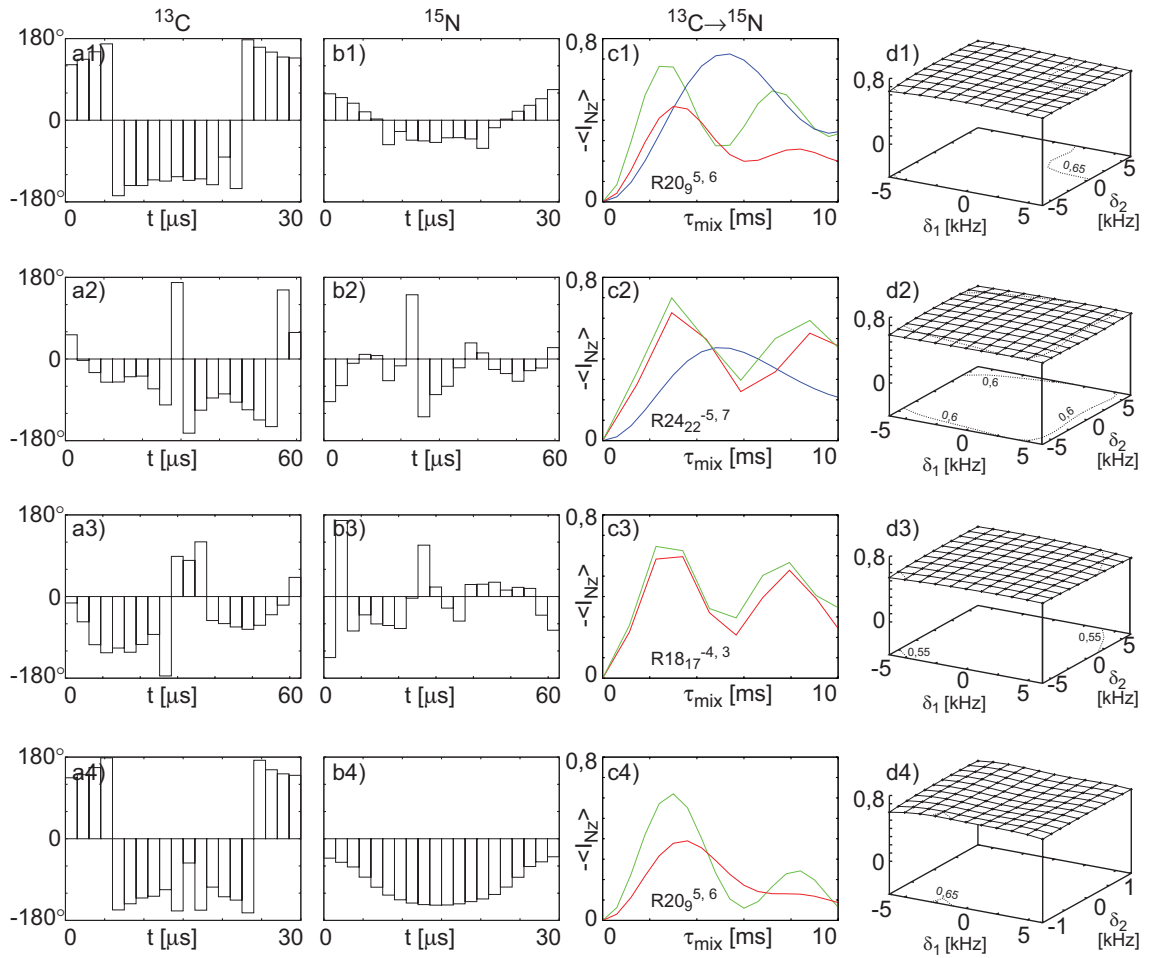
**Abb. 7.1:** In diesem Kapitel verwendete HF-Pulssequenz zur Aufnahme von  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren durch longitudinalen Magnetisierungsaustausch unter Verwendung von einem oder zwei Empfängern. Zur Aufnahme von Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung via ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )- bzw. ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ ) Magnetisierungsübertragung werden die blauen bzw. roten Pulse eingestrahlt. Die Phasenzyklen der HF-Pulse und Empfängerphasen:  $\phi_1 = (y, -y)$ ;  $\phi_2 = (x)$ ;  $\phi_3 = (y)$ ;  $\phi_4 = (2^* x, 2^* -x)$ ;  $\phi_6 = \phi_{10} = (8^* x, 8^* y, 8^* -x, 8^* -y)$ ;  $\phi_7 = (2^* y, 2^* -y)$ ;  $\phi_8 = (4^* x, 4^* -x)$ ;  $(\phi_R)_{15\text{N}} = (x, -x, -x, x, -x, x, x, -x, y, -y, y, y, -y, y, y, -y, -x, x, x, -x, x, -x, -x, x, -y, y, y, -y, y, -y, -y, y)$ ;  $(\phi_R)_{13\text{C}} = (x, -x, -x, x, x, -x, -x, x, y, -y, -y, y, y, -y, -y, y, -x, x, x, -x, -x, x, x, -x, -y, y, y, -y, -y, y, y, -y)$ .

wurden die Phasenmodulationsprofile der Basiselemente nicht mehr darauf beschränkt, symmetrisch zur Mitte des Pulses zu sein. Die Rechnungen wurden unter Berücksichtigung von  $\pm 5\%$  HF-Feldinhomogenitäten ausgeführt. Weitere Details der Optimierung entsprechen denen aus den vorhergehenden Kapiteln.

Die Leistungscharakteristika der symmetriebasierten  $\text{RN}_n^{v_s, v_k}$ -DQ-Pulssequenzen wurden auch experimentell durch Aufnahme von  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung überprüft. Dafür wurde die Pulssequenz aus Abb. 7.1 verwendet. Mittels der in modernen Spektrometern vorhandenen zwei Empfänger können die Signale beider Magnetisierungsübertragungswege ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ) und ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ ) gleichzeitig aufgenommen werden. Der Phasenzklus aus Abb. 7.1 eliminiert die unerwünschten Signale, welche zum Beispiel aus dem Übertragungsweg ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ) stammen. Mit nur einem Empfänger kann lediglich ein Magnetisierungsübertragungsweg gewählt werden. Die Pulssequenz ist folgendermaßen aufgebaut: Durch eine erste Kreuzpolarisation wird transversale  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Magnetisierung erzeugt. Diese entwickelt sich während  $t_1$  unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung und wird durch einen  $\pi/2$ -Puls parallel zur z-Achse gebracht. Die longitudinale Magnetisierung entwickelt sich dann während der Mischzeit  $\tau_{\text{mix}}$  unter dem Einfluss der dipolaren  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplung, welche durch Einstrahlen der  $\text{RN}_n^{v_s, v_k}$ -Sequenz auf die beiden Kanäle rückgekoppelt wird. Die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Magnetisierung wird am Ende der Mischzeit zurück in die transversale Ebene gelenkt und während  $t_2$  detektiert.

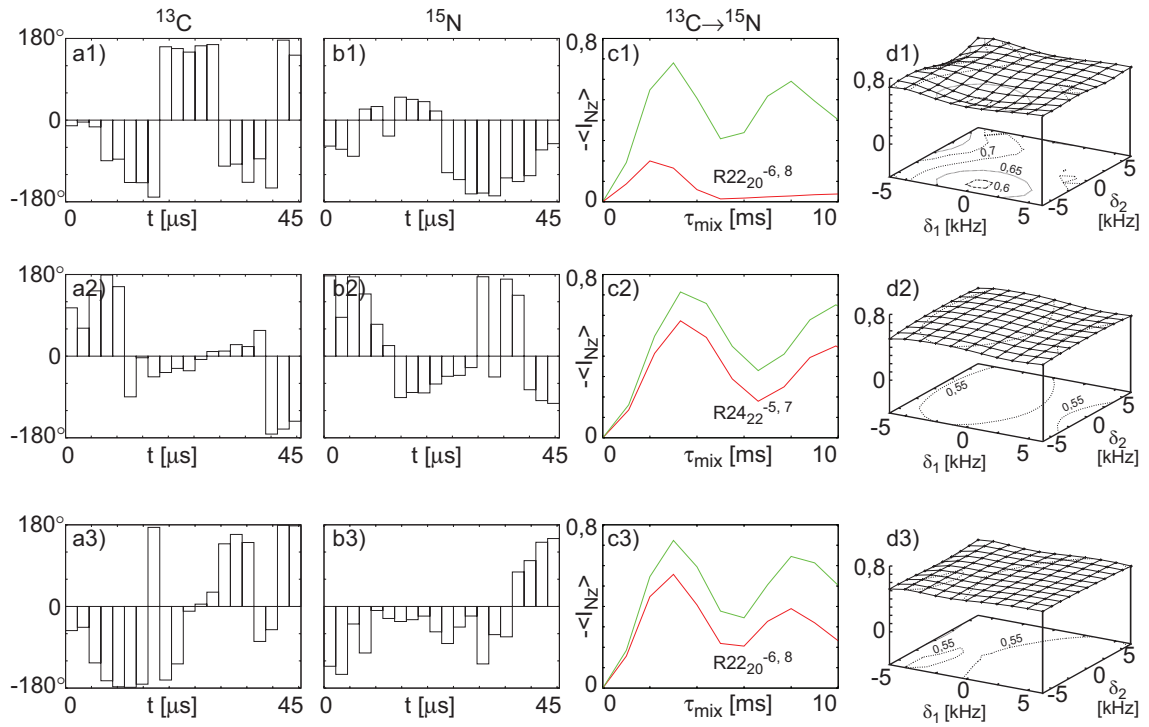


ren typischerweise in einer kurzen Zeitspanne ( $<1$  h) durchgeführt. Die simulierten Leistungscharakteristika einiger symmetriebasierter  $RN_n^{\nu_s, \nu_k}$ -Sequenzen für eine MAS-Frequenz von 15 kHz sind in Abb. 7.3 zusammen mit dem optimierten HF-Phasenmodulationsprofilen der Basiselemente (Abb. 7.3a1-a4, b1-b4) zu sehen. Die optimierten Profile in Abb. 7.3a1-a3, b1-b3 bzw. a4, b4 wurden unter Berücksichtigung eines Resonanzoffsetbereiches von  $(\pm 5\text{ kHz} / \pm 5\text{ kHz})$  bzw.  $(\pm 5\text{ kHz} / \pm 1\text{ kHz})$  für die  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -Kerne erreicht. Die Darstellungen in Abb. 7.3c1-c4 zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Stickstoff beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoffkerns, normiert auf das maximal übertragbare Signal. In Abb. 7.3d1-d4 ist die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Stickstoff in Abhängigkeit von den Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne zu den angegebenen Mischzeiten zu sehen. Die Pulsprofile wurden zuerst unter Berücksichtigung nominaler CSA-Werte optimiert (Abb. 7.3a1,b1; a4,b4). Diese Profile konnten zwar mit niedrigen HF-Feldstärken erstellt werden, aber in den numerischen Simulationen ist erkennbar, dass der erreichbare Maximalwert der Magnetisierungsübertragung dieser Sequenzen bei großen CSA-Werten nicht zufriedenstellend ist. Aufgründdessen wurden auch Pulse unter Berücksichtigung großer CSA-Werte optimiert (Abb. 7.3a2,b2; a3,b3). Im Vergleich zur Sequenz  $R24_9^{-5,-10}$  mit dem  $R$ -Basiselement  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)_\pi(\pi/3)_0\}^{s,k}$  [15] (Kurven in blau) ist die Wirksamkeit der numerisch optimierten symmetriebasierten Sequenzen deutlich besser. Analog zu den Graphen in Abb. 7.3 sind in Abb. 7.4 die simulierten Leistungscharakteristika einiger symmetriebasierter  $RN_n^{\nu_s, \nu_k}$ -Sequenzen, welche für eine MAS-Frequenz von 20 kHz generiert wurden, und die dazugehörigen, optimierten HF-Phasenmodulationsprofilen der Basiselemente (Abb. 7.4a1-a3, b1-b3) abgebildet. Die optimierten Pulse in Abb. 7.4a1,b1 bzw. a2,b2; a3,b3 wurden unter Berücksichtigung nomineller bzw. großer CSA-Werte generiert. Aus den Simulationen wird ein schneller und hoher Magnetisierungsübertrag der numerisch optimierten DQ-Rückkopplungssequenzen ersichtlich. Dies verdeutlicht, dass effiziente heteronukleare DQ-Rückkopplungssequenzen auch bei hohen MAS-Frequenzen unter Verwendung von nur moderaten  $^{13}\text{C}$ -/ $^{15}\text{N}$ -HF-Feldstärken von weniger als 50 kHz mit der in dieser Studie vorgestellten Optimierungsmethode generiert werden können. Wie erwartet, wird die Wirksamkeit dieser Sequenzen auch von geringen Variationen ( $\pm 5\%$ ) der HF-Feldstärke nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den bereits genannten Symmetrien konnte heteronukleare dipolare Rückkopplung auch mit anderen Symmetrien erreicht werden. Die Phasenmodulationsprofile der entsprechenden  $R$ -Basiselemente sind im Anhang gegeben.



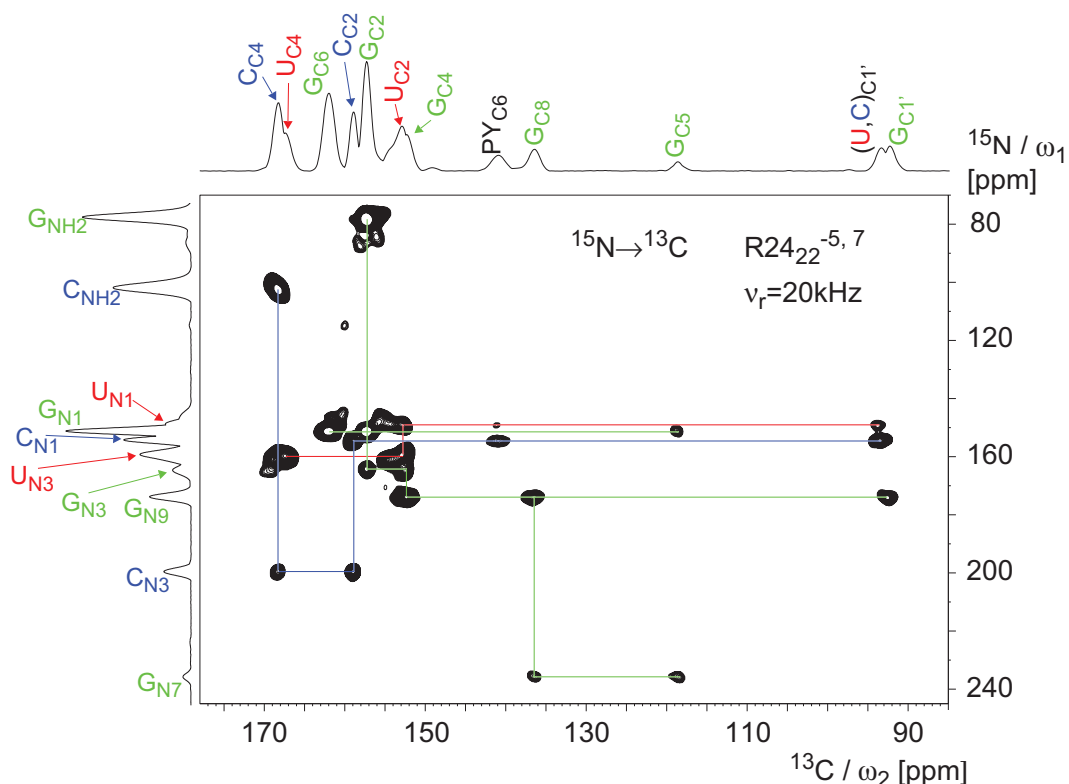
**Abb. 7.3:** (a1-a4, b1-b4) Numerisch optimierte Phasenmodulationsprofile und (c1-c4, d1-d4) dazugehörige simulierte Charakteristika der Magnetisierungsübertragung der symmetriebasierten Sequenzen (a1, b1, c1, d1)  $R20_9^{5,6}$ , (a2, b2, c2, d2)  $R24_{22}^{-5,7}$ , (a3, b3, c3, d3)  $R18_{17}^{-4,3}$  und (a4, b4, c4, d4)  $R20_9^{5,6}$ . Die Pulsprofile (a1-a3, b1-b3) bzw. (a4, b4) wurden unter Berücksichtigung von Resonanzoffsetbereichen von ( $\pm 5$  kHz /  $\pm 5$  kHz) bzw. ( $\pm 5$  kHz /  $\pm 1$  kHz) für  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -Kerne erzeugt. Die Optimierungen wurden durchgeführt für eine Drehfrequenz von 15 kHz und eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 500 MHz. Die Längen der R-Elemente betragen 30,0; 61,1; 63,0 bzw. 30,0  $\mu\text{s}$  und die Pulse wurden für  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -HF-Feldstärken von (35 kHz / 35 kHz), (44 kHz / 44 kHz), (43 kHz / 43 kHz) bzw. (35 kHz / 25 kHz) generiert. In (c1-c4) ist die Größe der übertragenen Magnetisierung (normiert auf das maximal übertragbare Signal) auf Stickstoff, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoffs, gezeigt. Die Simulationen wurden mit folgenden Parametern für das Spinsystem durchgeführt: (grün)  $^{13}\text{C}$ :  $\delta_{\text{iso}} = 0$  ppm;  $\delta_{\text{aniso}} = -19,43$  ppm;  $\eta = 0,98$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{99,4^\circ; 146,0^\circ; 138,9^\circ\}$ ;  $^{15}\text{N}$ :  $\delta_{\text{iso}} = 0$  ppm;  $\delta_{\text{aniso}} = 0$  ppm;  $\eta = 0$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 0^\circ\}$ ;  $D = 1000$  Hz;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 0^\circ\}$ ;  $J = 6,3$  Hz; (rot)  $^{13}\text{C}$ :  $\delta_{\text{iso}} = 0$  ppm;  $\delta_{\text{aniso}} = -76,0$  ppm;  $\eta = 0,9$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 94,0^\circ\}$ ;  $^{15}\text{N}$ :  $\delta_{\text{iso}} = 0$  ppm;  $\delta_{\text{aniso}} = 99,0$  ppm;  $\eta = 0,19$ ;  $\Omega_{\text{PM}} = \{-90^\circ; -90^\circ; -17^\circ\}$ ;  $D = 1000$  Hz;  $\Omega_{\text{PM}} = \{0^\circ; 0^\circ; 0^\circ\}$ ;  $J = 6,3$  Hz. Die Kurven in blau wurden mittels der Sequenz  $R24_9^{-5,-10}$  und dem R-Basiselement  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)_\pi(\pi/3)_0\}^{s,k}$  generiert, unter Verwendung (c1) nominaler bzw. (c2) großer CSA-Werte. (d1-d4) zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Stickstoff bei  $\tau_{\text{mix}} = 2,4$ ; 2,9; 2,4 bzw. 3,0 ms als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne, unter Verwendung (d1, d4) nominaler bzw. (d2, d3) großer CSA-Werte. Die HF-Phasenwerte der 20 Einzelintervalle der R-Basiselemente sind im Anhang gegeben.





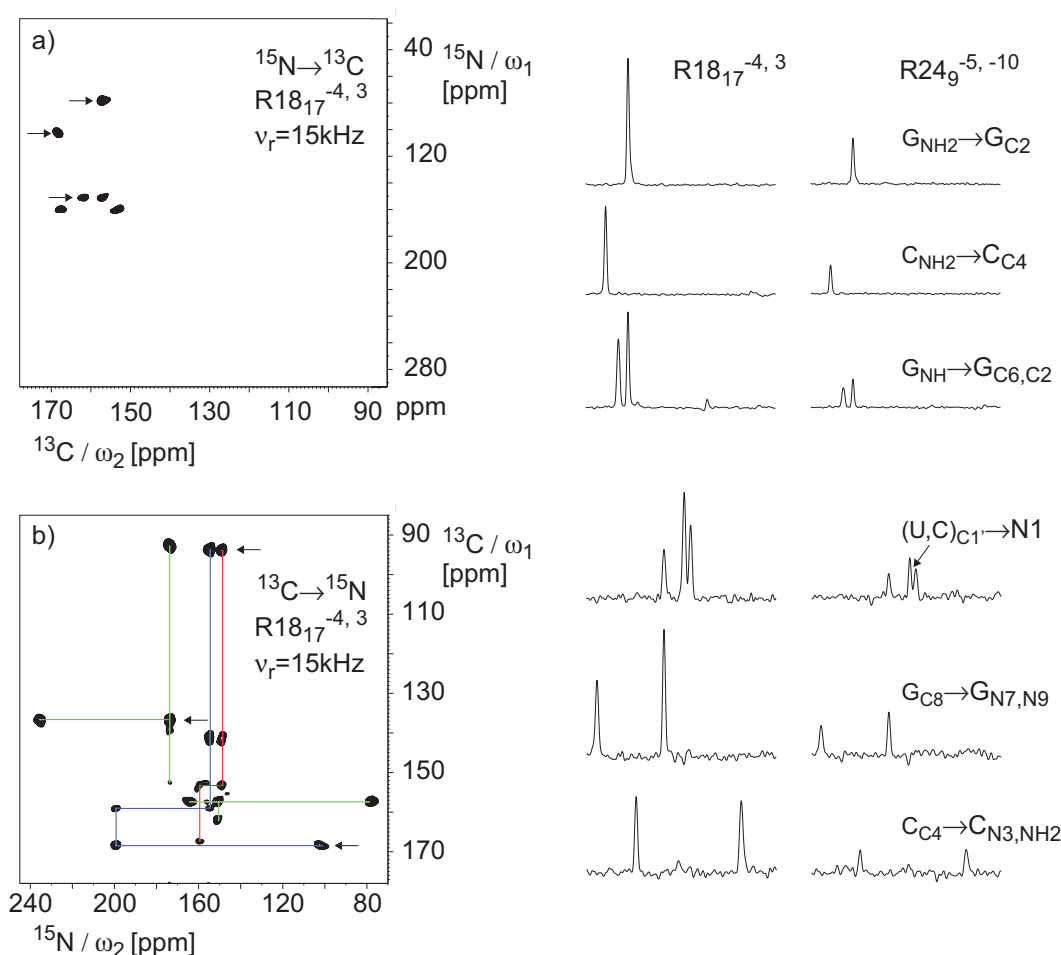
**Abb. 7.4:** (a1-a3, b1-b3) Numerisch optimierte Phasenmodulationsprofile und (c1-c3, d1-d3) dazugehörige simulierte Charakteristika der Magnetisierungsübertragung der symmetriebasierten Sequenzen (a1, b1, c1, d1)  $R22_{20}^{-6,8}$ , (a2, b2, c2, d2)  $R24_{22}^{-5,7}$  und (a3, b3, c3, d3)  $R22_{20}^{-6,8}$ . Die Pulsprofile (a1-a3, b1-b3) wurden unter Berücksichtigung von Resonanzoffsetbereichen von  $(\pm 5 \text{ kHz} / \pm 5 \text{ kHz})$  für  $^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$ -Kerne und (d1) nominaler bzw. (d2, d3) großer CSA-Werte erzeugt. Die Optimierungen wurden durchgeführt für eine Drehfrequenz von 15 kHz und eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 500 Mhz. Die Längen der R-Elemente betragen 45,5; 45,8 bzw. 45,5  $\mu\text{s}$  und die Pulse wurden für  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -HF-Feldstärken von (33 kHz / 33 kHz), (44 kHz / 44 kHz) bzw. (45 kHz / 45 kHz) generiert. In (c1-c3) ist die Größe der übertragenen Magnetisierung (normiert auf das maximal übertragbare Signal) auf Stickstoff, beginnend mit z-Magnetisierung des Kohlenstoffs, gezeigt. (d1-d3) zeigen die Größe der übertragenen Magnetisierung auf Stickstoff bei  $\tau_{\text{mix}}=3,0$ ; 3,3 bzw. 3,0 ms als Funktion der Resonanzoffsets der dipolar gekoppelten Kerne, unter Verwendung (d1) nominaler bzw. (d2, d3) großer CSA-Werte. Alle Simulationen wurden mit den Spinsystem-Parametern aus Abb. 7.3 durchgeführt. Die HF-Phasenwerte der 20 Einzelintervalle der R-Basiselemente sind im Anhang gegeben.

Die Leistungscharakteristika der hier beschriebenen symmetriebasierten Sequenzen wurden zuerst anhand experimenteller Messungen an einer L-Histidin-Probe eingeschätzt. Darauffolgend wurden einige Symmetrien ausgewählt, um  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung der (CUG)<sub>97</sub>-RNA aufzunehmen. Einige repräsentative Daten sind in Abb. 7.5 und 7.6 gegeben. Eine Drehfrequenz von (Abb. 7.5) 20 kHz und (Abb. 7.6) 15 kHz und die symmetriebasierten (Abb. 7.5)  $R24_{22}^{-5,7}$ - und (Abb. 7.6)  $R18_{17}^{-4,3}$ -DQ-Rückkopplungssequenzen wurden verwendet. Die Spektren in Abb. 7.5 und 7.6 wurden unter Verwendung von einem bzw. zwei Empfängern aufgenommen. Während das Spektrum in Abb. 7.5 unter Verwendung einer CP-Kontaktzeit von 2 ms generiert wurde, wurden die Spektren in Abb. 7.6 simultan und mit einer kurzen CP-Kontaktzeit von 300  $\mu\text{s}$  aufgenommen. Ein weiteres  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperiment wurde mittels



**Abb. 7.5:** 2D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum der chemischen Verschiebung generiert mittels longitudinalem Magnetisierungsaustausch bei einer Drehfrequenz von 20 kHz und unter Verwendung der symmetriebasierten  $R24_{22}^{-5,7}$ -DQ-Rückkopplungssequenz. Das Spektrum wurde mittels des Magnetisierungsübertragungsweges ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ) aufgenommen, mit einer CP-Kontaktzeit von 2 ms, 1,1 ms Mischzeit, den numerisch optimierten R-Elementen aus Abb. 7.4a2 und 7.4b2, mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken von 44 kHz, 96 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 96  $t_1$ -Inkrementen, einer spektralen Breite von 12000 Hz und einer Regenerierungszeit von 2,5 s. Die Trägerfrequenzen wurden in die Mitte des spektralen Fensters gesetzt.

der Symmetrie  $R24_9^{-5,-10}$  und dem aus konventionellen Rechteckpulsen zusammengesetzten R-Basiselement  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)_\pi(\pi/3)_0\}^{s,k}$  durchgeführt. Dabei wurden analog zu Abb. 7.6 zwei Spektren gleichzeitig mit zwei Empfängern aufgenommen. Vergleicht man die Signalintensitäten in den Querschnitten (Abb. 7.6) aus diesen Spektren, so ist ersichtlich, dass die experimentelle Wirksamkeit der symmetriebasierten Sequenz mit dem numerisch optimierten R-Basiselement in Übereinstimmung mit den Simulationen deutlich besser ist. Selbstverständlich hängen die Kreuzsignalintensitäten der heteronuklearen Korrelationsspektren nicht nur von der Effizienz der dipolaren Rückkopplungssequenz, sondern auch von der anfänglichen  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Magnetisierung zum Beginn der Mischzeit ab. Die große, für das Spektrum in Abb. 7.5 verwendete CP-Kontaktzeit führt sogar für  $^{15}\text{N}$ -Kerne ohne direkt gebundenem Proton zu  $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -Kreuzsignalen mit detektierbarer Intensität, wie zum Beispiel  $\text{N1}, \text{N9} \rightarrow \text{C1}'$ ;  $\text{G}_{\text{N7}} \rightarrow \text{G}_{\text{C5}, \text{C8}}$  (siehe auch Abb. 2.11). Alle erwarteten  $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -Signale, die zum charakteristischen Konnektivitätsmuster der verschiedenen Nukleotide führen, sind in diesem Spektrum klar erkenn-



**Abb. 7.6:** 2D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung generiert mittels longitudinalem Magnetisierungsaustausch bei einer Drehfrequenz von 15 kHz, unter Verwendung der symmetriebasierten  $R18_{17}^{-4,3}$ -DQ-Rückkopplungssequenz. Die Spektren (a,b) wurden simultan aufgenommen, mit einer CP-Kontaktzeit von 300  $\mu\text{s}$ , 1,13 ms Mischzeit, den numerisch optimierten R-Elementen aus Abb. 7.3a3 und 7.3b3, mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken von 43 kHz, 64 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 128  $t_1$ -Inkrementen, einer  $\omega_1$ -Spektralbreite von 14000 Hz und einer Regenerierungszeit von 2 s. Die Trägerfrequenzen wurden in allen Experimenten in die Mitte der spektralen Fenster gesetzt. Zum Vergleich sind einige repräsentative Querschnitte der Spektren (a) und (b) gegeben, sowie eines unter ähnlichen experimentellen Bedingungen generierten Spektrums aufgenommen mittels der Symmetrie  $R24_9^{-5,-10}$  und dem aus konventionellen Rechteckpuls zusammengesetzten R-Element  $\{(\pi/3)_0(5\pi/3)\pi(\pi/3)_0\}^{s,k}$ , einer Mischzeit von 1,2 ms und mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -HF-Feldstärken von 47 kHz.

bar. Erhebliche Relaxationsverluste bei langen CP-Kontaktzeiten können aber dazu führen, dass die Kreuzsignale von sehr geringer Intensität sind. In solchen Situationen ist die simultane Aufnahme von Signalen, die aus den Magnetisierungsübertragungswegen ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ) und ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ ) stammen, von Vorteil (Abb. 7.6). Obwohl die kurze Kontaktzeit dazu führt, dass hauptsächlich nur Kreuzsignale, die von  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernen mit direkt gebundenem Proton herrühren, zu sehen sind, ist der Informationsgehalt beider Spektren zusammen vergleichbar mit dem aus Abb. 7.5. So sind im Spektrum in Abb. 7.6b viele der  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationssignale zu sehen, welche in Abb. 7.6a fehlen (zum Beispiel  $\text{C1}' \rightarrow \text{N1}, \text{N9}$ ). Dieses Experiment bildet die Grundlage für die



Falls deuterierte Proben zur Verfügung stehen, können zusätzlich  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Entfernungen für austauschbare Protonen (zum Beispiel Amid- $^1\text{H}$ ) unter Ausnutzung des  $^1\text{H}$ -Magnetisierungsaustauschs aufgrund von dipolaren Proton-Proton-Kopplungen während der Mischzeit  $\tau_{mix}^{HH}$  gemessen werden. Diese bilden die Grundlage für eine Charakterisierung des untersuchten Proteins bzw. RNA.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass effiziente dipolare  $^{13}\text{C}$ – $^{15}\text{N}$ -Rückkopplungssequenzen nach der Auswahl passender Symmetrien erstellt werden können. Es sollte erwähnt werden, dass es notwendig ist, eine sehr große Anzahl von passenden Symmetrien zu untersuchen, um die bestmögliche dipolare Rückkopplungssequenz mit der geringsten HF-Feldstärke zu generieren. Dies könnte das Ziel weiterer Arbeiten sein. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der numerisch optimierten  $\text{RN}_n^{\nu_s, \nu_k}$ -Pulssequenzen wurde unter Verwendung der in modernen Spektrometern vorhandenen Möglichkeit, verschiedene Signale mit mehreren Empfängern aufzunehmen, demonstriert. Die daraus resultierenden  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektren liefern mehr Informationen als das Einzelexperiment bei gleicher Messzeit, falls lange CP-Kontaktzeiten zu großen Signalverlusten führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Resonanzzuordnungen und Untersuchungen der globalen Faltung durch die gleichzeitige Aufnahme von 3D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -( $^1\text{H}$ )- $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren in nur einem Messvorgang möglich sind. Da das Augenmerk auf dipolarer Rückkopplung über eine große Bandbreite lag, wurden in diesem Kapitel phasenmodulierte  $R$ -Elemente mit konstanter Amplitude genutzt. Dennoch kann diese Methode auch auf amplituden- und phasenmodulierte  $R$ -Elemente ausgeweitet werden, welche zum Beispiel für die Erstellung von bandselektiven Rückkopplungssequenzen nötig sind [75]. Vorstellbar ist auch eine Ausweitung auf Rückkopplungssequenzen, welche ohne simultane Einstrahlung von  $^1\text{H}$ -Entkopplung anwendbar sind.

## Kapitel 8

# MAS-Festkörper-NMR für RNA mit mehreren Empfängern

### 8.1 Einleitung

Aufgrund der gut aufgelösten chemischen Verschiebungen von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen werden homo- und heteronukleare Abstandsmessungen zwischen diesen Kernen in Strukturstudien mittels MAS-Festkörper-NMR verwendet. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten [13; 57; 59; 60; 83; 105] an vollständig protonierten ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-markierten Peptid-/Proteinproben zeigen, dass auch Entfernungen zwischen räumlich nahen  $^1\text{H}$ -Kernen abschätzbar sind. Auch diese Methoden nutzen die bessere spektrale Auflösung von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen. Allerdings werden hierbei die Korrelationen der chemischen Verschiebung indirekt durch dipolare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen vermittelt. Die in diesen Spektren (im Allgemeinen als CHHC-, CHHN-, NHHC-, NHHN-Spektren bezeichnet) beobachteten Kreuzsignalintensitäten sind abhängig von der räumlichen Nähe der Protonen, welche direkt an die jeweiligen beobachteten  $^{13}\text{C}$ -/ $^{15}\text{N}$ -Kernen gebunden sind. Kürzlich veröffentlichte Resultate unserer Gruppe [88; 90] zeigen, dass solche Experimente auch beträchtliches Potenzial für strukturelle Studien an RNA bieten. RNA-Moleküle spielen eine entscheidende Rolle in vielen biologischen Prozessen und weisen eine Vielzahl struktureller Eigenschaften auf. Die Tertiärstruktur ist geprägt durch basengepaarte Bereiche, zum Beispiel in reguläre oder irreguläre helikale Abschnitte. Die Identifizierung der Basenpaare sowie die Charakterisierung des zugrundeliegenden Wasserstoffbrückenbindungsmusters in RNA liefert somit wichtige strukturelle Informationen. Die verschiedenen kanonischen und nicht-kanonischen Basenpaarungen in Nukleinsäuren sind durch topologisch unterschiedliche Netzwerke starker dipolarer Proton-Proton-Kopplungen charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die Charakterisie-

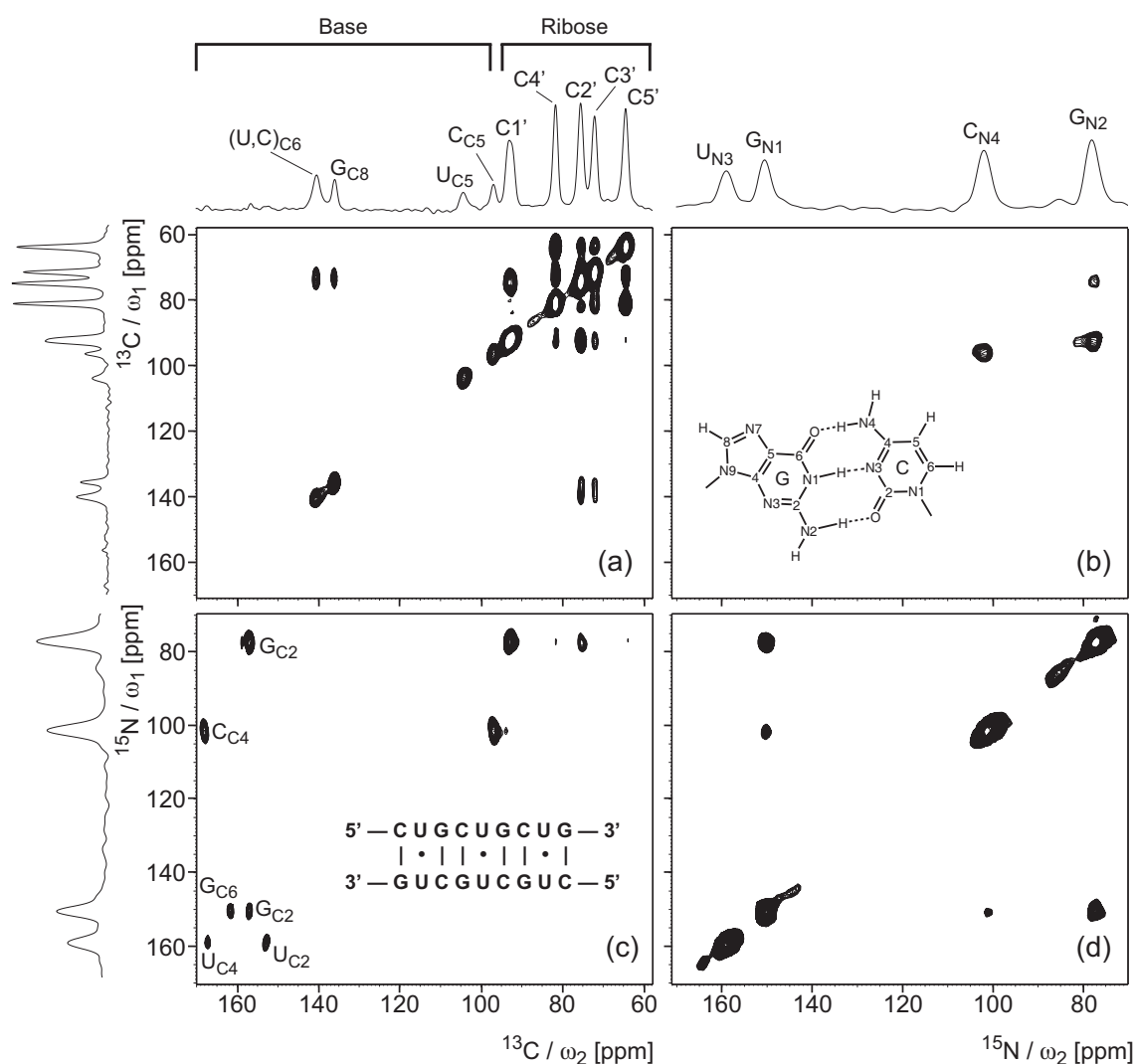


Datensatz	$\phi_2(\phi_4)$	$\phi_3$	$^{13}\text{C}$ -Signal	$^{15}\text{N}$ -Signal
1	$\phi_2(\phi_4)$	$\phi_3$	$(\text{N}+\text{P})_{t_1}$	$(\text{N}+\text{P})_{t_1}$
2	$\phi_2(\phi_4)+90^\circ$	$\phi_3+90^\circ$	$(\text{N}-\text{P})_{t_1}$	$(\text{N}-\text{P})_{t_1}$
3	$\phi_2(\phi_4)+180^\circ$	$\phi_3$	$-(\text{N}+\text{P})_{t_1}$	$(\text{N}+\text{P})_{t_1}$
4	$\phi_2(\phi_4)+270^\circ$	$\phi_3+90^\circ$	$-(\text{N}-\text{P})_{t_1}$	$(\text{N}-\text{P})_{t_1}$

**Tab. 8.1:** Phasenzyklus zur Aufnahme phasenempfindlicher Spektren sowie zur Separation der Modulationen der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Signale während  $t_1$ . Beide Empfänger nehmen diese vier Datensätze auf. Um CHHC- und CHHN-Spektren zu erhalten, muss die Differenz der Datensätze 3 und 1 als Realteil (N+P) sowie die Differenz der Datensätze 4 und 2 als Imaginärteil (N-P) genutzt werden. Mittels Addition der Datensätze 1 und 3 bzw. 2 und 4 erhält man den Real- sowie Imaginärteil der NHHC- und NHHN-Spektren.

zeitiger  $^1\text{H}$ -Entkopplung. Der zweite CP-Schritt überträgt die so modulierte  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Magnetisierung zurück auf die Protonen. Die  $^1\text{H}$ -Magnetisierung wird dann in die z-Achse ausgelenkt. Während der Protonen-Spin-Diffusionszeit [60; 88; 90]  $\tau_{mix}$  findet longitudinaler  $^1\text{H}$ -Magnetisierungsaustausch aufgrund von dipolaren Proton-Proton-Kopplungen statt. Die Proton-Magnetisierung am Ende von  $\tau_{mix}$  wird zurück in die transversale Ebene rotiert. Der letzte CP-Schritt überträgt die Polarisation der Protonen auf die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Kerne, um die gleichzeitige Detektion mittels zweier Empfänger auszunutzen. Das Experiment wird typischerweise mit sehr kurzen CP-Kontaktzeiten und Mischzeiten  $\tau_{mix}$  durchgeführt, um weitergeleitete Magnetisierungsübertragungen zu minimieren. Aufgrunddessen erwartet man Kreuzsignale mit nennenswerter Intensität nur zwischen Kernen, deren gebundene  $^1\text{H}$ -Kerne weniger als  $\approx 3 \text{ \AA}$  voneinander entfernt sind [59; 60; 83; 88; 90; 105]. Das aus  $90^\circ$ -Pulsen und Pausen zusammengesetzte Element  $\{(90)_x - (k-1)t_1 - (90)_{\phi_4}\}$ , welches auf den  $^{13}\text{C}$ -Kanal eingestrahlt wird, wird entfernt, wenn die benötigten  $\omega_1$ -Spektralbreiten für die  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne identisch sind. Falls sich diese unterscheiden, wird die Entwicklung der  $^{15}\text{N}$ -Magnetisierung unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung zuerst gestartet, da die benötigte spektrale Breite der  $^{15}\text{N}$ -Kerne im Allgemeinen kleiner ist. Während der Zeitspanne  $(k-1)t_1$  wird die  $^{13}\text{C}$ -Magnetisierung in der z-Achse gehalten. Das Verhältnis zwischen spektraler Breite von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen wird durch den Parameter  $k$  bestimmt. Standardphasenzyklen zur Selektierung der gewünschten Kohärenztransferwege und die States-Methode [100] wurden zur Generierung von phasenempfindlichen Spektren verwendet. Für jedes Inkrement in  $t_1$  wurden vier Datensätze akquiriert und, wie in Tab. 8.1 und im Anhang beschrieben, prozessiert. Dadurch konnten die Modulationen der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Signale, welche durch die zeitliche Entwicklung unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung während  $t_1$  hervorgerufen wurden, separiert werden [24; 82; 110]. Die Luftkühlung





**Abb. 8.2:** Experimentelle (a) CHHC-, (b) NHHC-, (c) CHHN- und (d) NHHN-Spektren der (CUG)<sub>97</sub>-RNA generiert mittels der Pulssequenz aus Abb. 8.1. Folgende Parameter wurden im Experiment verwendet:  $\omega_1$ -Spektalbreiten von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  von 8333,3 Hz bzw. 25000 Hz, eine Drehfrequenz von 25 kHz, CP-Kontaktzeiten von 200  $\mu\text{s}$ , eine Regenerierungszeit von 2 s, 256 Scans pro  $t_1$ -Inkrement, 40  $t_1$ -Inkmente und  $\tau_{\text{mix}}=160 \mu\text{s}$ . Die Zuordnungen der verschiedenen Resonanzen sind in den 1D-Spektren angegeben, welche mit kurzen CP-Kontaktzeiten aufgenommen wurden. Eine schematische Darstellung des verwendeten (CUG)<sub>97</sub>-Moleküls und das GC-Watson-Crick-Basenpaarschema sind auch abgebildet. Zusätzliche Details der spektralen Prozessierung sind im Anhang zu finden.

wurde bei einer Temperatur von  $\approx -50^\circ\text{C}$  gehalten, was einer Proben temperatur von ca.  $0^\circ\text{C}$  bei einer Drehfrequenz von 33 kHz entspricht. Das Prozessieren der NMR-Daten wurde mittels der NMRpipe-Software [21] durchgeführt.

### 8.3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 8.2a-d sind die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung der (CUG)<sub>97</sub>-Probe zu sehen, welche mit der Pulssequenz aus Abb. 8.1 aufgenommen wurden. Es wurde eine Drehfrequenz von 25 kHz und eine Spin-Diffusionszeit von 160  $\mu\text{s}$  verwendet. Die Resonanzzuordnungen basieren auf früheren Studien unserer Grup-

pe [89]. Die beobachteten spektralen Charakteristika entsprechen den Erwartungen und sind konsistent mit früher veröffentlichten Daten [88; 90]. Strukturell aussagekräftige Schlussfolgerungen können nicht nur aus der Präsenz sondern auch aus der Abwesenheit von bestimmten Kreuzsignalen gezogen werden. Zum Beispiel deutet die Abwesenheit von Kreuzsignalen zwischen den aromatischen und Ribose-C1'-Kohlenstoffen im CHHC-Spektrum (Abb. 8.2a) auf einen  $\chi$ -Winkel im *anti*-Bereich hin [90]. Ebenso sind die C8/C6- (aromatische Kohlenstoffe)  $\leftrightarrow$  C2'/C3'- (Riboseanteil) Kreuzsignale klar erkennbar. Diese können entweder aufgrund sequentieller oder Intranukleotid-Wechselwirkungen entstehen, da die Abstände der entsprechenden Protonen innerhalb der Detektionsgrenze von 3 Å liegen, wenn der  $\chi$ -Winkel im *anti*-Bereich vorliegt [90]. Im NHHN-Spektrum (Abb. 8.2d) sieht man das Kreuzsignal zwischen Guanin-Imino ( $G_{N1}$ )- und Cytosin-Amino ( $C_{N4}$ )-Stickstoff. Dies ist ein Merkmal für Watson-Crick-GC-Basenpaare, in denen sich das Guanin-Iminoproton in räumlicher Nähe zum Cytosin-Aminoproton des gegenüberliegenden Stranges befindet [98]. Die spektralen Charakteristika der CHHN- (Abb. 8.2b) und NHHC- (Abb. 8.2c) Daten entsprechen ebenfalls den Erwartungen. Aufgrund der geringeren Sensitivität von  $^{15}\text{N}$ -Detektion sind die im CHHN-Spektrum auftretenden Signalintensitäten typischerweise geringer als die entsprechenden Intensitäten im NHHC-Spektrum. Mit dem Winkel  $\chi$  im *anti*-Bereich ist die intranukleotide Entfernung zwischen dem Guanin-H1' und dem sich nicht in einer Wasserstoffbrückenbindung befindenden Guanin-Aminoproton größer als 4 Å. Deswegen wird kein Intranukleotid-Kreuzsignal zwischen dem Guanin-Aminostickstoff ( $G_{N2}$ ) und Ribose-C1'-Kohlenstoff im NHHC-/CHHN-Spektrum erwartet. Dennoch ist aus Flüssigkeits-NMR-Studien bekannt, dass sich in einer A-Form-Helix das Guanin-Aminoproton, welches keine Wasserstoffbrückenbindung eingeht, in räumlicher Nähe zum Ribose-H1'-Proton des benachbarten Nukleotids des gleichen Strangs befindet [39]. Deshalb ist die Präsenz dieses Kreuzsignals im Spektrum konsistent mit der A-helikalen Konformation dieser RNA [90]. Ein weiteres starkes Kreuzsignal ist zwischen dem Amino-Stickstoff ( $C_{N4}$ ) und dem aromatischen C5-Kohlenstoff ( $C_{C5}$ ) von Cytosin in den NHHC-/CHHN-Spektren zu erkennen. Dieses resultiert aus der geringen Entfernung zwischen dem Aminoproton, welches sich nicht in einer Wasserstoffbrückenbindung befindet, und dem aromatischen H5-Proton von Cytosin und erlaubt die Zuordnung dieser Resonanzen. Obwohl Kreuzsignale nur zwischen Kernen auftreten sollten, welche an Protonen gebunden sind, zeigt das NHHC-Spektrum eine Reihe von Kreuzsignalen zwischen Stickstoffen und quaternären Kohlenstoffen ohne direkt gebundene Protonen.

Diese resultieren aus Magnetisierungsübertragung während des letzten CP-Schrittes [96]. Mittels der in dieser Studie verwendeten kurzen CP-Kontaktzeit entstehen solche Kreuzsignale hauptsächlich durch heteronukleare dipolare Wechselwirkungen über kurze Entfernungen innerhalb eines Nukleotides und bieten somit eine bequeme alternative Methode zur Zuordnung vieler der wichtigen quaternären Kohlenstoffresonanzen in RNA. Diese Signale können durch eine weitere Reduzierung der CP-Kontaktzeit unterdrückt werden. Allerdings war in unseren Untersuchungen ersichtlich, dass dies auch zu einer Abnahme der Intensitäten anderer Signale von Interesse führt. Es sollte auch erwähnt werden, dass es bei separater Durchführung der Experimente möglich ist, die CP-Kontaktzeiten der  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Kerne unabhängig voneinander zu optimieren. Normalerweise benötigt die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kreuzpolarisation eine kürzere CP-Kontaktzeit als die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Polarisationsübertragung. Bei der in dieser Studie verwendeten Drehfrequenz von 25 kHz wurde experimentell eine CP-Kontaktzeit von 200  $\mu\text{s}$  als optimal ermittelt, um zufriedenstellende Übertragung zu  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen gleichzeitig zu erreichen. Mit solch kurzen CP-Kontaktzeiten zeigten sich keine erheblichen Signalverluste während gleichzeitiger  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ -Kreuzpolarisation.

Die Verfügbarkeit solch komplementärer Datensätze ist auch hilfreich, um eine detaillierte quantitative Analyse der Kreuzsignalintensitäten in Abhängigkeit von der Mischzeit durchzuführen. Zum Beispiel kann eine Analyse der beobachteten Kreuzsignalintensitäten im NHHN-Spektrum (Abb. 8.2d) zu fehlerhaften Resultaten führen, falls ausschließlich ein dipolares Spin-Netzwerk von mit  $^{15}\text{N}$ -Kernen gekoppelten Protonen berücksichtigt wird. Das NHHC-Spektrum (Abb. 8.2c) zeigt nämlich klar die Präsenz eines viel größeren homo- und heteronuklearen dipolaren Spin-Netzwerkes auf, in dem die Protonen ebenso mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen gekoppelt sind. Also ist die gleichzeitige Aufnahme aller relevanter Kreuzsignalintensitäten der verschiedenen Datensätze notwendig, um  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Distanzen quantitativ zu bestimmen.

Im Kontext von Flüssigkeits-NMR-Studien wurde kürzlich demonstriert, dass die Messzeit mittels gleichzeitiger Aufnahme von Signalen verschiedener Kerne reduziert werden kann [56]. Dieses Kapitel zeigt, dass diese Methode auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie, zum Beispiel zur zeiteffizienten Aufnahme mehrdimensionaler Korrelationsspektren, hervorragend einsetzbar ist. Zusätzlich wird ein geeigneter Phasenzyklus verwendet, um die Signale der  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Magnetisierung gleichzeitig zu erhalten, welche während der  $t_1$ -Zeitspanne unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung moduliert werden. Es wurde gezeigt, dass in einem einzigen Experiment eine Vielzahl

von strukturellen Informationen und Resonanzzuordnungen von ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-markierten RNA gewonnen werden können. Obwohl die hier aufgezeigte Methode im Kontext von RNA demonstriert wurde, kann ist sie ebenso geeignet, Datenaufnahmezeiten in Experimenten an Peptiden und Proteinen zu verringern.

## Kapitel 9

### Zusammenfassung

Das grundlegende Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Verbesserung homo- und heteronuklearer Rückkopplungssequenzen zur Erzeugung von Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung, welche für Strukturstudien an biomolekularen Systemen unter Verwendung hoher MAS-Frequenzen genutzt werden können.

In einem ersten Schritt wurden die Möglichkeiten zur Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren der chemischen Verschiebung mittels Inversionspulsen mit niedrigem HF-Leistungsfaktor untersucht. Diese Untersuchungen bauten auf früheren Studien unserer Arbeitsgruppe auf [92], in denen durch Durchführung von Korrelationsexperimenten ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung während der Mischzeit Interferenzen zwischen dem Entkopplungs- und Rückkopplungskanal verhindert wurden. Dies führte zur Verringerung von Signalverlusten. Allerdings besitzt der dort verwendete tanh/tan-Puls einen hohen HF-Leistungsfaktor. Daher können solche Mischsequenzen potentiell Schäden an der Probe und/oder der NMR-Technik verursachen. In diesem Zusammenhang wurde hier eine Vielzahl von adiabatischen Pulsen mit verschiedenen Amplituden- und Frequenzprofilen sowohl für longitudinalen als auch für transversalen Magnetisierungsübertrag getestet. Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass adiabatische Pulse mit niedrigem HF-Leistungsfaktor für longitudinalen Magnetisierungsaustausch ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung vorteilhaft sind. Hingegen sind adiabatische tanh/tan-Pulse in transversalen Mischsequenzen ohne heteronukleare Entkopplung effektiver. Die Ursache dieser Unterschiede konnte durch Betrachtung der Trajektorie der relevanten Magnetisierungskomponente geklärt werden. Diese hat einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtleistung der Mischsequenz.

Weiterhin wurde gezeigt, dass breitbandige, phasenmodulierte Inversions- und Universalrotationspulse mittels globaler Optimierungsprozeduren wie den Genetischen Algo-

rithmen unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden HF-Feldstärke konstruiert werden können. Diese konnten effektiv in Mischsequenzen zur Rückkopplung dipolarer Wechselwirkungen eingesetzt werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde gezeigt, wie das Potenzial der symmetriebasierten Methode genutzt werden kann, um effiziente und breitbandige Mischsequenzen auch für hohe MAS-Frequenzen zu konstruieren. Hierbei wird das Basiselement einer symmetriebasierten Sequenz optimiert, um effektive Magnetisierungsübertragung zu erreichen. Experimentelle Anforderungen und Einschränkungen wie Rotationsfrequenz, Resonanzoffset, CSA-Werte und Kompensation von  $B_1$ -Inhomogenitäten werden dabei berücksichtigt. Mit Inversions-, Universalrotations- und  $360^\circ$ -Pulsen als Startwerte der Optimierung wurden effiziente homonukleare  $CN_n^V$ - und  $RN_n^V$ -Mischsequenzen sowie heteronukleare  $RN_n^{V_s, V_k}$ -Rückkopplungssequenzen generiert. Es zeigte sich, dass die Effektivität der optimierten  $CN_n^V$ - und  $RN_n^V$ -Sequenzen vergleichbar war. Um die bestmögliche Lösung zu finden, wurden zwei ebenbürtige Varianten genutzt, das Phasenmodulationsprofil der Basiselemente darzustellen: (i) als Teilsumme einer Fourierreihe oder (ii) eingeteilt in eine kleine Zahl kurzer Intervalle gleicher Länge. Die zufriedenstellende Leistung der numerisch optimierten Sequenzen wurde anhand der Ergebnisse der Simulationen sowie anhand von Korrelationsexperimenten der chemischen Verschiebung von L-Histidin, L-Arginin und der (CUG)<sub>97</sub>-RNA auch im Vergleich zur Verwendung von konventionellen Rechteckpulsen gezeigt. Die vorgestellte Optimierungsmethode ist an die experimentellen Gegebenheiten anpassbar und erweiterbar auf verschiedene andere Rückkopplungssequenzen. Vorstellbar ist zum Beispiel die Anwendung auf heteronukleare dipolare Rückkopplungssequenzen der REDOR-Variante [30] mit Unterdrückung der Effekte der chemischen Verschiebung und der homonuklearen dipolaren Kopplung, welche auch zur Rückkopplung der CSA genutzt werden können. Die Ersetzung der lokalen Optimierung durch globale Optimierungsprozeduren könnte das Ziel zukünftiger Studien sein. Diese Arbeit beschäftigt sich darüber hinaus mit der in modernen Spektrometern vorhandenen Möglichkeit, verschiedene Signale mit mehreren Empfängern simultan aufzunehmen. Mithilfe von numerisch optimierten  $RN_n^{V_s, V_k}$ -Pulssequenzen wurden sowohl  $^{15}\text{N}$ – $^{13}\text{C}$ - als auch  $^{13}\text{C}$ – $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren gleichzeitig erzeugt. Diese Spektren liefern mehr Informationen als das Einzelexperiment bei gleicher Messzeit, falls lange CP-Kontaktzeiten zu erheblichen Signalverlusten führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Aufnahme von 3D- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -( $^1\text{H}$ )- $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren möglich ist. Somit können in nur einem Messvorgang Resonanzzuord-

nungen getroffen und Untersuchungen der globalen Faltung durchgeführt werden. Eine weitere Anwendung mehrerer Empfänger ist die gleichzeitige Aufnahme von CHHC-, NHHN-, NHHC- sowie CHHN-Spektren. Mit solchen Experimenten ist es möglich, das Wasserstoffbrückenbindungsmuster und den glykosidischen Torsionswinkel  $\chi$  in RNA zu charakterisieren. Zusätzlich können Aussagen über den Riboseanteil sowie die helikalen Regionen getroffen werden. Dies wurde anhand der (CUG)<sub>97</sub>-RNA demonstriert. Die gleichzeitige Aufnahme aller relevanten Kreuzsignale der Korrelationsspektren führt nicht nur zu erheblicher Zeitersparnis, sondern ist auch zur quantitativen Bestimmung von <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-Distanzen notwendig.

# Literaturverzeichnis

- [1] AGARWAL, V. ; REIF, B. : Residual methyl protonation in perdeuterated proteins for multi-dimensional correlation experiments in MAS solid-state NMR spectroscopy. In: *J. Magn. Reson.* 194 (2008), S. 16
- [2] ANDREW, E. ; BRADBURY, A. ; EADES, R. : Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. In: *Nature* 182 (1958), S. 1659
- [3] BAK, M. ; RASMUSSEN, J. T. ; NIELSEN, N. C.: SIMPSON: a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. In: *J. Magn. Reson.* 147 (2000), S. 296
- [4] BAK, M. ; NIELSEN, N. C.: REPULSION, A Novel Approach to Efficient Powder Averaging in Solid-State NMR. In: *J. Magn. Reson.* 125 (1997), S. 132
- [5] BALDUS, M. ; MEIER, B. H.: Total correlation spectroscopy in the solid state. The use of scalar couplings to determine the through-bond connectivity. In: *J. Magn. Reson. A* 121 (1996), S. 65
- [6] BAYRO, M. J. ; RAMACHANDRAN, R. ; CAPORINI, M. A. ; EDDY, M. T. ; GRIFFIN, R. G.: Radio frequency-driven recoupling at high magic-angle spinning frequencies: homonuclear recoupling sans heteronuclear decoupling. In: *J. Chem. Phys.* 128 (2008), S. 052321
- [7] BENNETT, a. E. ; OK, J. H. ; GRIFFIN, R. G. ; VEGA, S. : Chemical-Shift Correlation Spectroscopy in Rotating Solids - Radio Frequency-Driven Dipolar Recoupling and Longitudinal Exchange. In: *J. Chem. Phys.* 96 (1992), S. 8624
- [8] BENNETT, a. E. ; RIENSTRA, C. M. ; GRIFFITHS, J. M. ; ZHEN, W. G. ; LANSBURY, P. T. ; GRIFFIN, R. G.: Homonuclear radio frequency-driven recoupling in rotating solids. In: *J. Chem. Phys.* 108 (1998), S. 9463
- [9] *Kapitel* Recoupling of Homo- and Heteronuclear Dipolar Interactions in Rotating Solids. In: BENNETT, A. ; GRIFFIN, R. ; VEGA, S. : *NMR Basic Principles and Progress, Volume 32.* Springer Verlag, 1994
- [10] BENNETT, A. E. ; RIENSTRA, C. M. ; AUGER, M. ; LAKSHMI, K. V. ; GRIFFIN, R. G.: Heteronuclear decoupling in rotating solids. In: *J. Chem. Phys.* 103 (1995), S. 6951
- [11] BLANCO, F. ; TYCKO, R. : Determination of Polypeptide Backbone Dihedral Angles in Solid State NMR by Double Quantum  $^{13}\text{C}$  Chemical Shift Anisotropy Measurements. In: *J. Magn. Reson.* 149 (2001), S. 131
- [12] BLOCH, F. ; HANSEN, W. W. ; PACKARD, M. : Nuclear Induction. In: *Phys. Rev.* 69 (1946), S. 127
- [13] BOER, I. de ; BOSMAN, L. ; RAAP, J. ; OSCHKINAT, H. ; GROOT, H. J. M.: 2D  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  MAS NMR correlation spectroscopy with mixing by true  $^1\text{H}$  spin diffusion reveals long-range intermolecular distance restraints in ultra high magnetic field. In: *J. Magn. Reson.* 157 (2002), S. 286



- [14] BRINKMANN, A. ; GUNNE, J. S. A. D. ; LEVITT, M. H.: Homonuclear zero-quantum recoupling in fast magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. In: *J. Magn. Reson.* 156 (2002), S. 79
- [15] BRINKMANN, A. ; LEVITT, M. H.: Symmetry principles in the nuclear magnetic resonance of spinning solids: Heteronuclear recoupling by generalized Hartmann-Hahn sequences. In: *J. Chem. Phys.* 115 (2001), S. 357
- [16] CARRAVETTA, M. ; EDEN, M. ; XIN, Z. ; BRINKMANN, A. ; LEVITT, M. H.: Symmetry principles for the design of radiofrequency pulse sequences in the nuclear magnetic resonance of rotating solids. In: *Chem. Phys. Lett.* 321 (2000), S. 205
- [17] CASTELLANI, F. ; ROSSUM, B. J. ; DIEHL, A. ; REHBEIN, K. ; OSCHKINAT, H. : Determination of solid-state NMR structures of proteins by means of three-dimensional  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar correlation spectroscopy and chemical shift analysis. In: *Biochem.* 42 (2003), S. 11476
- [18] CASTELLANI, F. ; ROSSUM, B. van ; DIEHL, A. ; SCHUBERT, M. ; REHBEIN, K. ; OSCHKINAT, H. : Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. In: *Nature* 420 (2002), S. 98
- [19] CHARLET-B., N. ; SAVKUR, R. S. ; SINGH, G. ; PHILIPS, A. V. ; GRICE, E. A. ; COOPER, T. A.: Loss of the Muscle-Specific Chloride Channel in Type 1 Myotonic Dystrophy Due to Mis-regulated Alternative Splicing. In: *Mol. Cell* 10 (2002), S. 45
- [20] CHENG, V. B. ; HENRY H. SUZUKAWA, J. ; WOLFSBERG, M. : Investigations of a nonrandom numerical method for multidimensional integration. In: *J. Chem. Phys.* 59 (1973), S. 3992
- [21] DELAGLIO, F. ; GRZESIEK, S. ; VUISTER, G. W. ; ZHU, G. ; PFEIFER, J. ; BAX, A. : NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. In: *J. Biomol. NMR* 6 (1995), S. 277
- [22] DETKEN, a. ; HARDY, E. H. ; ERNST, M. ; KAINOSHO, M. ; KAWAKAMI, T. ; AIMOTO, S. ; MEIER, B. H.: Methods for sequential resonance assignment in solid, uniformly  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  labelled peptides: Quantification and application to antamanide. In: *J. Biomol. NMR* 20 (2001), S. 203
- [23] DUSOLD, S. ; SEBALD, A. : Dipolar recoupling under magic-angle spinning conditions. In: *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 41 (2000), S. 185
- [24] FARMER, B. T.: Simultaneous [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HMQC, a pseudo-triple-resonance experiment. In: *J. Magn. Reson.* 93 (1991), S. 635
- [25] FORREST, S. : Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation. In: *Science* 261 (1993), S. 872
- [26] FREEMAN, R. ; XILI, W. : Design of magnetic resonance experiments by genetic evolution. In: *J. Magn. Reson.* 75 (1987), S. 184
- [27] FRERICKS, H. L. ; ZHOU, D. H. ; YAP, L. L. ; GENNIS, R. B. ; RIENSTRA, C. M.: Magic-angle spinning solid-state NMR of a 144 kDa membrane protein complex: E. coli cytochrome bo3 oxidase. In: *J. Biomol. NMR* 36 (2006), S. 55
- [28] GOLDBERG, D. E.: *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Addison-Wesley publishing company, Massachusetts, 1989

- [29] GRIFFIN, R. G.: Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids. In: *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998), S. 508
- [30] GULLION, T. ; SCHAEFER, J. : Rotational-echo double-resonance NMR. In: *J. Magn. Reson.* 81 (1989), S. 196
- [31] GULLION, T. ; BAKER, D. B. ; CONRADI, M. S.: New, compensated Carr-Purcell sequences. In: *J. Magn. Reson.* 89 (1990), S. 479
- [32] HAEBERLEN, U. ; WAUGH, J. S.: Coherent Averaging Effects in Magnetic Resonance. In: *Phys. Rev.* 175 (1968), S. 453
- [33] HANSEN, J. A. ; KEHLET, C. ; BJERRING, M. ; VOSEGAARD, T. ; GLASER, S. J. ; KHANEJA, N. ; NIELSEN, N. C.: Optimal control based design of composite dipolar recoupling experiments by analogy to single-spin inversion pulses. In: *Chem. Phys. Lett.* 447 (2007), S. 154
- [34] HARDY, E. H. ; DETKEN, A. ; MEIER, B. H.: Fast-MAS total through-bond correlation spectroscopy using adiabatic pulses. In: *J. Magn. Reson.* 165 (2003), S. 208
- [35] HARTMANN, S. R. ; HAHN, E. : Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. In: *Phys. Rev.* 128 (1962), S. 2042
- [36] HAUPT, R. ; HAUPT, S. : *Practical genetic algorithms*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, 2004
- [37] HEINDRICH, A. S. D. ; GEEN, H. ; GIORDANI, C. ; TITMAN, J. J.: Improved scalar shift correlation NMR spectroscopy in solids. In: *Chem. Phys. Lett.* 335 (2001), S. 89
- [38] HERBST, C. ; RIEDEL, K. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Solid state NMR at high magic angle spinning frequencies: dipolar chemical shift correlation with adiabatic inversion pulse based RF pulse schemes. In: *J. Biomol. NMR.* 35 (2006), S. 241
- [39] HEUS, H. A. ; PARDI, A. : Novel proton NMR assignment procedure for RNA duplexes. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), S. 4360
- [40] HOHWY, M. ; JAKOBSEN, H. J. ; EDÉN, M. ; LEVITT, M. H. ; NIELSEN, N. C.: Broadband dipolar recoupling in the nuclear magnetic resonance of rotating solids: A compensated C7 pulse sequence. In: *J. Chem. Phys.* 108 (1998), S. 2686
- [41] HONG, M. ; GROSS, J. D. ; GRIFFIN, R. G.: Site-Resolved Determination of Peptide Torsion Angle  $\phi$  from the Relative Orientations of Backbone N-H and C-H Bonds by Solid-State NMR. In: *J. Phys. Chem. B* 101 (1997), S. 5869
- [42] HONG, M. : Resonance assignment of  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  labeled solid proteins by two- and three-dimensional magic-angle-spinning NMR. In: *J. Biomol. NMR* 15 (1999), S. 1
- [43] HUGHES, C. E. ; LUCA, S. ; BALDUS, M. : Radio-frequency driven polarization transfer without heteronuclear decoupling in rotating solids. In: *Chem. Phys. Lett.* 385 (2004), S. 435
- [44] HWANG, T. L. ; ZIJL, P. C. ; GARWOOD, M. : Fast broadband inversion by adiabatic pulses. In: *J. Magn. Reson.* 133 (1998), S. 200
- [45] ISHII, Y. :  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar recoupling under very fast magic angle spinning in solid-state nuclear magnetic resonance: Applications to distance measurements, spectral assignments, and high-throughput secondary-structure determination. In: *J. Chem. Phys.* 114 (2001), S. 8473

- [46] *Kapitel Genetic algorithms and their use in chemistry.* In: JUDSON, R. : *Reviews in computational chemistry, vol 10.* VCH Publishers, New York, 1997
- [47] KANADIA, R. N. ; JOHNSTONE, K. A. ; MANKODI, A. ; LUNGU, C. ; THORNTON, C. A. ; ESSON, D. ; TIMMERS, A. M. ; HAUSWIRTH, W. W. ; SWANSON, M. S.: A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. In: *Science* 302 (2003), S. 1978
- [48] KEHLET, C. ; BJERRING, M. ; SIVERTSEN, A. C. ; KRISTENSEN, T. ; ENGHILD, J. J. ; GLASER, S. J. ; KHANEJA, N. ; NIELSEN, N. C.: Optimal control based NCO and NCA experiments for spectral assignment in biological solid-state NMR spectroscopy. In: *J. Magn. Reson.* 188 (2007), S. 216
- [49] KERVERN, G. ; PINTACUDA, G. ; EMSLEY, L. : Fast Adiabatic Pulses for Solid-State NMR of Paramagnetic Systems. In: *J. Magn. Reson.* 147 (2000), S. 296
- [50] KIRKPATRICK, S. ; GELATT, C. D. ; VECCHI, M. P.: Optimization by Simulated Annealing. In: *Science* 220 (1983), S. 671
- [51] KIRSCHSTEIN, A. ; HERBST, C. ; RIEDEL, K. ; CARELLA, M. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Broadband homonuclear TOCSY with amplitude and phase-modulated RF mixing schemes. In: *J. Biomol. NMR* 40 (2008), S. 227
- [52] KIRSCHSTEIN, A. ; HERBST, C. ; RIEDEL, K. ; CARELLA, M. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Heteronuclear J cross-polarisation in liquids using amplitude and phase modulated mixing sequences. In: *J. Biomol. NMR* 40 (2008), S. 277
- [53] KOBZAR, K. ; SKINNER, T. E. ; KHANEJA, N. ; GLASER, S. J. ; LUY, B. : Exploring the limits of broadband excitation and inversion pulses. In: *J. Magn. Reson.* 170 (2004), S. 236
- [54] KRISTIANSEN, P. E. ; MITCHELL, D. J. ; EVANS, J. N. S.: Double-Quantum Dipolar Recoupling at High Magic-Angle Spinning Rates. In: *J. Magn. Reson.* 157 (2002), S. 253
- [55] KUPCE, E. ; FREEMAN, R. : Optimized Adiabatic Pulses for Wideband Spin Inversion. In: *J. Magn. Reson. A* 118 (1996), S. 299
- [56] KUPCE, E. ; FREEMAN, R. ; JOHN, B. K.: Parallel acquisition of two-dimensional NMR spectra of several nuclear species. In: *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), S. 9606
- [57] LANGE, A. ; BECKER, S. ; SEIDEL, K. ; GILLER, K. ; PONGS, O. ; BALDUS, M. : A concept for rapid protein-structure determination by solid-state NMR spectroscopy. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005), S. 2089
- [58] LANGE, A. ; GILLER, K. ; HORNIG, S. ; MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F. ; PONGS, O. ; BECKER, S. ; BALDUS, M. : Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. In: *Nature* 440 (2006), S. 959
- [59] LANGE, A. ; LUCA, S. ; BALDUS, M. : Structural constraints from proton-mediated rare-spin correlation spectroscopy in rotating solids. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), S. 9704
- [60] LANGE, A. ; SEIDEL, K. ; VERDIER, L. ; LUCA, S. ; BALDUS, M. : Analysis of proton-proton transfer dynamics in rotating solids and their use for 3D structure determination. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), S. 12640
- [61] LAWS, D. D. ; BITTER, H. M. L. ; JERSCHOW, A. : Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002), S. 3096

- [62] LEPPERT, J. ; HEISE, B. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Broad-band RFDR with adiabatic inversion pulses. In: *J. Biomol. NMR* 26 (2003), S. 13
- [63] LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Adiabatic TOBSY in rotating solids. In: *J. Biomol. NMR* 29 (2004), S. 167
- [64] LEPPERT, J. ; URBINATI, C. R. ; HÄFNER, S. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; SWANSON, M. S. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Identification of NH...N hydrogen bonds by magic angle spinning solid state NMR in a double-stranded RNA associated with myotonic dystrophy. In: *Nucleic Acids Res.* 32 (2004), S. 1177
- [65] LEVITT, M. H. ; FREEMAN, R. ; FRENKIEL, T. : Broadband Decoupling in High-Resolution NMR Spectroscopy. In: *Adv. Magn. Reson.* 11 (1983), S. 47
- [66] *Kapitel Symmetry-Based Pulse Sequences in Magic-Angle Spinning Solid-State NMR.* In: LEVITT, M. : *Encyclopedia of NMR.* Wiley, Chichester, New York, 2002
- [67] LOPEZ, J. J. ; KAISER, C. ; SHASTRI, S. ; GLAUBITZ, C. : Double quantum filtering homonuclear MAS NMR correlation spectra: a tool for membrane protein studies. In: *J. Biomol. NMR* 41 (2008), S. 97
- [68] LOPEZ, J. J. ; SHUKLA, A. K. ; REINHART, C. ; SCHWALBE, H. ; MICHEL, H. ; GLAUBITZ, C. : The structure of the neuropeptide bradykinin bound to the human G-protein coupled receptor bradykinin B2 as determined by solid-state NMR spectroscopy. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008), S. 1668
- [69] LOWE, I. : Free Induction Decays of Rotating Solids. In: *Phys. Rev. Lett.* 2 (1959), S. 285
- [70] MANKODI, A. ; TAKAHASHI, M. P. ; JIANG, H. ; BECK, C. L. ; BOWERS, W. J. ; MOXLEY, R. T. ; CANNON, S. C. ; THORNTON, C. A.: Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of *ClC-1* chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. In: *Mol. Cell* 10 (2002), S. 35
- [71] MARIN-MONTESINOS, I. ; BROUWER, D. H. ; ANTONIOLI, G. ; LAI, W. C. ; BRINKMANN, A. ; LEVITT, M. H.: Heteronuclear decoupling interference during symmetry-based homonuclear recoupling in solid-state NMR. In: *J. Magn. Reson.* 177 (2005), S. 307
- [72] METROPOLIS, N. ; ROSENBLUTH, A. W. ; ROSENBLUTH, M. N. ; TELLER, A. H. ; TELLER, E. : Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. In: *J. Chem. Phys.* 21 (1953), S. 1087
- [73] MILLER, J. W. ; URBINATI, C. R. ; TENG-UMNUAY, P. ; STENBERG, M. G. ; BYRNE, B. J. ; THORNTON, C. A. ; SWANSON, M. S.: Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. In: *EMBO J.* 19 (2000), S. 4439
- [74] MOU, Y. ; CHAO, J. C. H. ; CHAN, J. C. C.: Efficient Spin-Spin Scalar Coupling Mediated <sup>13</sup>C Homonuclear Polarization Transfer in Biological Solids without Proton Decoupling. In: *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 29 (2006), S. 278
- [75] NIELSEN, A. B. ; BJERRING, M. ; NIELSEN, J. T. ; NIELSEN, N. C.: Symmetry-based dipolar recoupling by optimal control: band-selective experiments for assignment of solid-state NMR spectra of proteins. In: *J. Chem. Phys.* 131 (2009), S. 025101
- [76] OLSEN, G. L. ; EDWARDS, T. E. ; DEKA, P. ; VARANI, G. ; SIGURDSSON, S. T. ; DROBNY, G. P.: Monitoring tat peptide binding to TAR RNA by solid-state <sup>31</sup>P-<sup>19</sup>F REDOR NMR. In: *Nucleic Acids Res.* 33 (2005), S. 3447

- [77] PAËPE, G. D. ; BAYRO, M. J. ; LEWANDOWSKI, J. ; GRIFFIN, R. G.: Broadband homonuclear correlation spectroscopy at high magnetic fields and MAS frequencies. In: *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), S. 1776
- [78] PAULI, J. ; BALDUS, M. ; ROSSUM, B. van ; GROOT, H. de ; OSCHKINAT, H. : Backbone and side-chain  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  signal assignments of the  $\alpha$ -spectrin SH3 domain by magic angle spinning solid-state NMR at 17.6 Tesla. In: *Chembiochem* 2 (2001), S. 272
- [79] PETKOVA, A. T. ; BUNTOWSKY, G. ; DYDA, F. ; LEAPMAN, R. D. ; YAU, W.-M. ; TYCKO, R. : Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a  $\beta$ -amyloid peptide. In: *J. Mol. Biol.* 335 (2004), S. 247
- [80] PINES, a. ; GIBBY, M. G. ; WAUGH, J. S.: Proton-Enhanced NMR of Dilute Spins in Solids. In: *J. Chem. Phys.* 59 (1973), S. 569
- [81] PURCELL, E. M. ; TORREY, H. C. ; POUND, R. V.: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. In: *Phys. Rev.* 69 (1946), S. 37
- [82] RAMACHANDRAN, R. ; SICH, C. ; GRÜNE, M. ; SOSKIC, V. ; BROWN, L. R.: Sequential assignments in uniformly  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labelled RNAs: the HC(N,P) and HC(N,P)-CCH-TOCSY experiments. In: *J. Biomol. NMR* 7 (1996), S. 251
- [83] REIF, B. ; ROSSUM, B. J. V. ; CASTELLANI, F. ; REHBEIN, K. ; DIEHL, A. ; OSCHKINAT, H. : Characterization of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  distances in a uniformly  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -labeled SH3 domain by MAS solid-state NMR spectroscopy. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), S. 1488
- [84] RIEDEL, K. : *Methoden zur Untersuchung biologischer Moleküle mittels Festkörper-Kernresonanzspektroskopie*, Friedrich-Schiller-University, Jena, Diss., 2007
- [85] RIEDEL, K. ; HERBST, C. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Broadband homonuclear double-quantum NMR/filtering via zero-quantum dipolar recoupling in rotating solids. In: *Chem. Phys. Lett.* 424 (2006), S. 178
- [86] RIEDEL, K. ; HERBST, C. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Heteronuclear decoupling in rotating solids: Improving the efficacy of  $\text{CN}_n^v$  symmetry-based tanh/tan adiabatic RF pulse schemes. In: *Chem. Phys. Lett.* 429 (2006), S. 590
- [87] RIEDEL, K. ; LEPPERT, J. ; HÄFNER, S. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Homonuclear chemical shift correlation in rotating solids via  $\text{RN}_n^v$  symmetry-based adiabatic RF pulse schemes. In: *J. Biomol. NMR* 30 (2004), S. 389
- [88] RIEDEL, K. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Characterisation of hydrogen bonding networks in RNAs via magic angle spinning solid state NMR spectroscopy. In: *J. Biomol. NMR* 31 (2005), S. 331
- [89] RIEDEL, K. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : TEDOR with adiabatic inversion pulses: Resonance assignments of  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  labelled RNAs. In: *J. Biomol. NMR* 31 (2005), S. 49
- [90] RIEDEL, K. ; HERBST, C. ; HÄFNER, S. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; SWANSON, M. S. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Constraints on the structure of (CUG) $_{97}$  RNA from magic-angle-spinning solid-state NMR spectroscopy. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006), S. 5620

- [91] RIEDEL, K. ; HERBST, C. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Tailoring broadband inversion pulses for MAS solid state NMR. In: *J. Biomol. NMR.* 35 (2006), S. 275
- [92] RIEDEL, K. ; HERBST, C. ; LEPPERT, J. ; OHLENSCHLÄGER, O. ; GÖRLACH, M. ; RAMACHANDRAN, R. : Broadband homonuclear chemical shift correlation at high MAS frequencies: a study of tanh/tan adiabatic RF pulse schemes without  $^1\text{H}$  decoupling during mixing. In: *J. Biomol. NMR* 37 (2007), S. 277
- [93] RIENSTRA, C. M. ; HOHWY, M. ; HONG, M. ; GRIFFIN, R. G.: 2D and 3D  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift correlation spectroscopy of solids: Assignment of MAS spectra of peptides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), S. 10979
- [94] RIENSTRA, C. M. ; TUCKER-KELLOGG, L. ; JARONIEC, C. P. ; HOHWY, M. ; REIF, B. ; McMAHON, M. T. ; TIDOR, B. ; LOZANO-PÉREZ, T. ; GRIFFIN, R. G.: De novo determination of peptide structure with solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), S. 10260
- [95] ROSSUM, B. J. ; CASTELLANI, F. ; REHBEIN, K. ; PAULI, J. ; OSCHKINAT, H. : Assignment of the nonexchanging protons of the alpha-spectrin SH3 domain by two- and three-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  solid-state magic-angle spinning NMR and comparison of solution and solid-state proton chemical shifts. In: *Chembiochem* 2 (2001), S. 906
- [96] ROSSUM, B.-J. van ; GROOT, C. P. ; LADIZHANSKY, V. ; VEGA, S. ; GROOT, H. J. M.: A Method for Measuring Heteronuclear ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) Distances in High Speed MAS NMR. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), S. 3465
- [97] ROSSUM, B.-J. van ; CASTELLANI, F. ; PAULI, J. ; REHBEIN, K. ; HOLLANDER, J. ; GROOT, H. J. M. ; OSCHKINAT, H. : Assignment of amide proton signals by combined evaluation of HN, NN and HNCA MAS-NMR correlation spectra. In: *J. Biomol. NMR* 25 (2003), S. 217
- [98] SAENGER, W. : *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, New York, 1984
- [99] SIEMER, A. B. ; RITTER, C. ; STEINMETZ, M. O. ; ERNST, M. ; RIEK, R. ; MEIER, B. H.:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  resonance assignment of parts of the HET-s prion protein in its amyloid form. In: *J. Biomol. NMR* 34 (2006), S. 75
- [100] STATES, D. J. ; HABERKORN, R. A. ; RUBEN, D. J.: A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. In: *J. Magn. Reson.* 48 (1982), S. 286
- [101] SUN, B. Q. ; RIENSTRA, C. M. ; COSTA, P. R. ; WILLIAMSON, J. R. ; GRIFFIN, R. G.: 3D  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  chemical shift correlation spectroscopy in rotating solids. In: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), S. 8540
- [102] TSENG, Y.-H. ; MOU, Y. ; MOU, C.-Y. ; CHAN, J. C. C.: Double-quantum NMR spectroscopy based on finite pulse RFDR. In: *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 27 (2005), S. 266
- [103] TYCKO, R. : Application of solid state NMR to the structural characterization of amyloid fibrils: methods and results. In: *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 42 (2003), S. 53
- [104] TYCKO, R. : Sensitivity enhancement in two-dimensional solid-state NMR spectroscopy by transverse mixing. In: *ChemPhysChem* 5 (2004), S. 863

- [105] TYCKO, R. ; ISHII, Y. : Constraints on supramolecular structure in amyloid fibrils from two-dimensional solid-state NMR spectroscopy with uniform isotopic labeling. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), S. 6606
- [106] VEN, F. van d.: *Multidimensional NMR in Liquids*. VCH Publishers, Inc., 1995
- [107] VESHTORT, M. ; GRIFFIN, R. G.: SPINEVOLUTION: a powerful tool for the simulation of solid and liquid state NMR experiments. In: *J. Magn. Reson.* 178 (2006), S. 248
- [108] WALL, M. : *GAlib: a C++ Library of genetic algorithm components*. <http://lancet.mit.edu/ga/>. Version: 2.4.7
- [109] WAUGH, J. : In: *4th Ampere Int. Summer School*. Pula, Yugoslavia, 1976
- [110] WØRENSEN, O. : Aspects and prospects of multidimensional time-domain spectroscopy. In: *J. Magn. Reson.* 89 (1990), S. 210
- [111] WU, X.-L. ; FREEMAN, R. : Darwin's ideas applied to magnetic resonance. The marriage broker. In: *J. Magn. Reson.* 85 (1989), S. 414
- [112] XU, P. ; WU, X.-L. ; FREEMAN, R. : User-friendly selective pulses. In: *J. Magn. Reson.* 99 (1992), S. 308
- [113] ZHOU, D. H. ; SHAH, G. ; CORMOS, M. ; MULLEN, C. ; SANDOZ, D. ; RIENSTRA, C. M.: Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz magic-angle spinning. In: *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007), S. 11791
- [114] ZHOU, D. H. ; SHEA, J. J. ; NIEUWKOOP, A. J. ; FRANKS, W. T. ; WYLIE, B. J. ; MULLEN, C. ; SANDOZ, D. ; RIENSTRA, C. M.: Solid-state protein-structure determination with proton-detected triple-resonance 3D magic-angle-spinning NMR spectroscopy. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007), S. 8380

Allgemeine Grundlagenliteratur des Fachgebietes:

Ernst, R.R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A.: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Clarendon Press, Oxford, 1987

Evans, J.N.S.: *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, Oxford, 1995

Günther, H.: *NMR-Spektroskopie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1992

Laws, D.D.; Bitter, H.M.; Jerschow, A.: Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002), S. 3096

Levitt, M.H.: *Spin Dynamics - Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley and Sons, Chichester, 2001

Munowitz, M.: *Coherence and NMR*. John Wiley and Sons, New York, 1988

Schatz, H.; Weidinger, A.: *Nukleare Festkörperphysik*. B.G. Teubner, Stuttgart, 1992

Schlichter, C.P.: *Principles of Magnetic Resonance*. Springer Verlag, Berlin, 1961

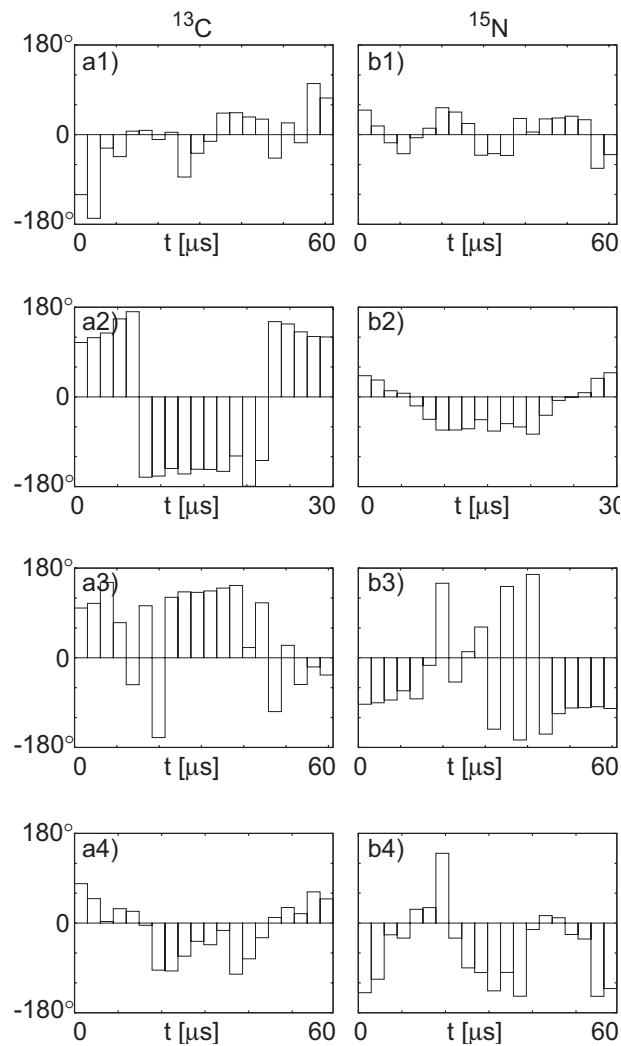
Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H.W.: *Multidimensional Solid State NMR and Polymers*. Academic Press, London, 1994

van de Ven, F.J.M.: *Multidimensional NMR in Liquids*. VCH Publishers, Inc., 1995



## Anhang A

### Weitere Phasenmodulationsprofile



**Abb. A.1:** Zusätzlich zu Kap. 7 numerisch optimierte Phasenmodulationsprofile der symmetriebasierten Sequenzen (a1, b1)  $\text{R14}_{13}^{-3,4}$ , (a2, b2)  $\text{R20}_9^{5,6}$ , (a3, b3)  $\text{R24}_{22}^{-5,7}$  und (a4, b4)  $\text{R16}_{19}^{-7,4}$ . Folgende Parameter wurden in der Optimierung verwendet: eine Zeeman-Feldstärke entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 500 Mhz, eine Drehfrequenz von (a1,b1; a2,b2; a3,b3) 15 kHz bzw. (a4,b4) 20 kHz, Pulsängen von 61,9; 30,0; 61,1 bzw. 59,4  $\mu\text{s}$ , Resonanzoffsetbereiche von (a1,b1; a2,b2; a4,b4)  $(\pm 5 \text{ kHz} / \pm 5 \text{ kHz})$  bzw. (a3,b3)  $(\pm 5 \text{ kHz} / \pm 1 \text{ kHz})$  für  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -Kerne,  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -HF-Feldstärken von (44 kHz / 44 kHz), (35 kHz / 35 kHz), (25 kHz / 15 kHz) bzw. (45 kHz / 45 kHz) und (a1,b1; a4,b4) nominale bzw. (a2,b2; a3,b3) große CSA-Werte (siehe Abb. 7.3). Die HF-Phasenwerte der 20 Einzelintervalle der Basiselemente sind im Folgenden gegeben.

## Anhang B

### HF-Phasenwerte

#### Abb. 5.1

**a)** 0,00; -74,36; 56,25; 68,01; -49,16; 29,37; 60,15; 56,25; 48,37; 32,18; 43,69; 8,82; -167,09; 36,93; -157,27; 168,84; -74,36; -151,83; -139,18; -142,11; -131,59; -167,09; -175,88; 160,72; -163,79

**b)** 0,00; 18,88; -6,07; -21,74; -6,07; -35,76; -65,12; -34,79; -65,12; -34,79; -64,33; -40,95; 141,15; 132,08; 141,15; 136,27; 136,27; 141,15; 132,08; 123,77; 132,08; -139,63; -171,62; -139,63; -171,62

**c)** 0,00; 0,00; 0,00; 60,71; 50,89; 51,17; 67,28; 81,48; 67,28; 50,89; 62,46; 81,48; -87,09; -87,09; -142,63; -116,83; -116,83; -91,11; -93,35; -116,83; -116,83; -133,93; 160,96; -142,63; 160,96

**d)** 0,00; -3,39; -34,85; -73,48; -78,80; -107,08; -78,80; -107,24; -107,24; -73,48; -72,06; -107,08; -78,80; 62,38; 86,07; 86,07; 86,07; 90,85; 104,12; 90,85; 90,85; 94,08; 120,82; 162,93; 162,93

**i)** 0,00; 17,65; 4,94; 0,00; 17,30; 1,45; 4,94; 9,05; 4,94; 4,94; 0,00; 7,76; -0,71; -1,24; 1,45; -32,90; -29,34; -29,34; -58,41; -26,80; -65,61; -65,61; -58,41; -58,41; -47,39

**j)** 0,00; -9,08; -9,38; 0,00; -24,81; -9,58; -9,38; -18,31; -31,36; -9,38; -9,38; -9,38; -19,83; -38,66; -27,85; -28,98; -18,31; -39,61; -62,61; -54,99; -62,61; -96,24; -77,16; -77,16; -94,64

**k)** 0,00; 0,00; -11,55; 5,15; 0,00; -11,55; -9,41; -8,86; -8,86; -7,04; -7,46; -11,55; 0,00; 9,16; 0,00; 0,00; -7,04; 29,57; 29,57; 41,29; 44,89; 44,89; 75,05; 75,05; 71,39

**l)** 0,00; -12,79; -16,82; -3,56; -12,79; 0,00; -5,67; 0,00; -0,36; -0,36; 24,13; -3,03; 0,00; -0,36; 23,69; 23,69; 37,08; 24,13; 61,82; 47,59; 70,27; 84,74; 72,81; 76,90; 72,81

#### Abb. 5.2

**a)** 0,00; 37,93; 78,14; -53,70; -68,25; -91,10; -82,97; 0,00; -46,86; 82,08; 98,21; -112,64; -101,48; 150,39; 98,21; 37,93; 120,30; -98,11; 131,60; 98,21; 82,08; 120,30; -91,10; -151,92; -171,27

**b)** 0,00; -11,41; -8,41; 142,52; 126,20; -46,66; -75,53; -75,53; -127,76; -35,69; -82,06; 50,77; 93,26; -156,14; 98,28; 51,15; -137,17; 57,21; -12,81; 112,37; 126,07; 51,15; -126,27; -160,99; 142,52

**c)** 0,00; 67,71; 71,87; 99,42; 104,94; -4,70; -56,71; -68,63; -42,56; -1,54; -140,62; 149,97; -0,39; -56,71; 28,21; 34,56; 38,31; 69,06; -1,54; -90,16; -90,16; -80,56; -107,93; 38,31; -56,71

**d)** 0,00; -59,41; -59,23; -59,23; 102,57; 134,53; 87,63; 0,00; -129,20; -59,23; -141,52; -71,82; -59,23; 87,63; 87,63; -174,64; 91,47; 59,10; 14,84; 87,63; 59,10; 179,23; 169,88; -153,42; 102,57

**i)** 0,00; 8,98; 0,00; -34,82; 2,29; 13,68; 10,93; -27,15; 6,74; 43,12; 43,12; 44,08; 74,61; 74,02; -18,72;

54,45; 13,68; 3,94; 77,28; 2,29; 36,71; -53,01; -106,16; -91,77; 0,00

j) 0,00; 59,69; 62,00; 72,91; 59,69; 95,62; 95,62; 95,62; -2,87; 0,55; -2,87; 19,88; 49,23; 35,05; -2,46; -2,87; 41,17; 19,88; 49,23; 73,34; -2,87; 129,25; 168,35; 95,62; 158,95

k) 0,00; 1,06; -155,99; -88,66; -82,95; -77,39; -71,19; -115,24; -59,81; -6,82; 1,06; -39,81; 1,06; -43,96; 1,06; -70,20; -39,81; -97,19; -26,13; -37,64; -26,13; -127,44; 173,75; 158,20; -155,99

l) 0,00; -14,89; 25,14; -76,04; 0,00; 20,93; -30,26; 0,23; 105,10; 82,52; 31,97; 95,64; 90,15; 65,03; 31,97; 25,14; 20,93; 102,41; 50,65; 43,78; -30,26; 13,02; -150,74; -92,95; -73,81

### **Abb. 5.3**

a) 0,00; -1,40; 0,08; -2,50; 12,88; -41,49; 35,49; -178,64; -174,43; 13,80; 123,28; 21,00; 23,30; 14,46; 12,09; 38,41; 108,98; 133,65; 171,10; 143,60; 138,35; 128,09; 119,29; 116,71; 111,94

d) 0,00; 3,37; -0,71; -2,56; -11,53; 69,19; -158,57; -7,35; -2,62; 0,27; 3,19; 2,87; 4,96; 20,27; 51,39; 76,62; 84,42; 95,67; 104,77; 104,87; 81,95; 76,28; 68,89; 61,66; 60,38

### **Abb. 5.5**

a) 0,00; 75,23; 115,72; 135,79; 147,37; 130,59; 154,29; 156,31; 151,99; 175,53; -159,34; -130,10; -115,51; -115,62; -115,41; -114,17; -113,84; -115,82; -115,61; -115,75; -116,57; -122,33; -125,66; -123,43; -118,10

e) 0,00; 84,36; 131,32; 159,90; 178,26; -165,34; -147,94; -131,78; -120,62; -109,23; -115,35; -106,13; -123,44; -123,80; -149,59; -114,42; -95,57; -93,84; -85,27; -75,44; -92,80; -120,05; -129,22; -130,96; -127,32

### **Abb. 6.1**

a) -6,94; 107,78; 123,44; 144,25; 130,31; -34,03; -28,41; 32,44; -9,34; -9,34

b) 44,18; -72,21; -127,74; -159,91; -136,27; 60,73; -12,22; 4,80; 32,96; 4,80

c) 17,19; -77,83; 174,13; 174,13; 174,13; 12,03; -43,92; 12,03; 12,03; 12,03

d) 1,86; 99,11; -113,76; 159,24; -125,24; 99,11; -5,11; 9,07; 1,22; 1,22

i) -35,50; -123,18; -101,20; -52,42; -138,20; 50,54; 93,95; 108,73; -11,37; 15,95

j) -113,51; 103,67; -76,86; -106,35; -79,73; -122,86; -89,17; -123,92; 19,41; -5,84

k) 105,76; 105,76; -96,63; -96,63; -94,56; -96,63; -116,52; -118,04; -14,95; -4,79

l) 117,69; 59,07; 117,69; -4,61; 176,41; -152,22; -4,61; 110,49; 15,16; -2,06

### **Abb. 6.2**

a1) 0,00; 64,26; 87,62; 95,70; 68,90; -128,82; 110,35; -3,00; -133,15; -50,81; 70,28; -75,53; -84,50; -152,96; -143,41; 179,23; -171,02; -144,28; -178,98; 165,01

a2) 0,00; -12,14; 62,36; -97,65; -5,18; 123,82; -30,52; -178,23; -145,67; -129,28; -137,00; -157,25; -155,66; -152,13; -152,73; -150,21; 119,77; -66,12; -94,57; -79,14

a3) 0,00; -1,93; 16,18; 145,05; 173,23; 112,84; 113,48; 92,68; 88,70; 81,24; 96,55; 106,27; 121,95; 127,19;

-86,05; 96,24; -94,68; -69,38; -46,23; -39,84

**a4)** 0,00; 9,65; -23,04; 109,84; -97,24; 171,97; -171,29; -113,16; -128,17; -71,48; -81,05; -98,83; -94,56; -102,51; -120,04; -103,72; 62,32; 132,90; 72,62; 47,46

#### **Abb. 6.4**

**a1)** 0,00; 22,34; 49,60; 54,16; 54,70; 17,95; 14,72; 58,84; 74,94; 39,97

**a2)** 0,00; -35,21; -52,88; -59,33; -66,68; -42,00; -18,42; -83,60; -75,65; -70,33

**a3)** 0,00; 25,97; 57,92; 64,13; -3,89; 39,89; 40,49; 21,55; -6,35; 2,53

**a4)** 0,00; 135,18; 144,80; 154,40; 164,58; 177,88; 77,13; 139,12; 125,59; 81,95

**a5)** 40,81; 22,29; 1,04; -11,08; -18,83; -16,95; 9,25; 33,11; 12,55; -28,88; -35,97; -10,15; 5,64  
dementsprechende Fourierkoeffizienten:  $a_1=13,73$ ;  $a_2=2,79$ ;  $a_3=18,17$ ;  $a_4=14,45$ ;  $a_5=-14,79$ ;  $a_6=9,05$ ;  $a_7=1,86$ ;  $a_8=-1,68$

#### **Abb. 7.3**

**a1)** 122,43; 134,35; 150,87; 168,34; -166,38; -143,93; -144,01; -131,45; -134,12; -124,43; -132,60; -129,23; -142,08; -81,19; -150,60; 177,35; 160,90; 150,15; 139,29; 137,26

**b1)** 58,24; 49,99; 37,49; 18,53; 2,66; -53,85; -24,88; -43,95; -45,57; -48,89; -38,70; -38,44; -41,20; -62,02; -16,51; 2,44; 19,77; 32,87; 47,49; 67,57

**a2)** 53,43; -3,03; -29,86; -51,04; -50,67; -39,14; -37,64; -65,70; -101,15; 168,62; -163,49; -112,84; -85,91; -76,95; -95,20; -111,91; -134,33; -149,03; 152,25; 58,51

**b2)** -93,98; -58,64; -9,43; 10,21; 7,59; -47,80; -15,06; 141,65; -127,33; -78,45; -60,12; -19,36; 35,51; 13,50; -23,08; -32,13; -49,10; -25,74; -19,77; 25,08

**a3)** -14,12; -55,67; -106,10; -123,95; -113,49; -122,79; -105,77; -83,53; -175,08; 88,56; 79,63; 120,58; -52,85; -59,68; -67,05; -72,30; -63,37; -40,12; -18,95; 42,22

**b3)** -134,51; 167,59; -75,95; -40,31; -60,32; -63,84; -70,42; -3,66; 113,29; 20,90; -25,51; -54,11; 26,58; 27,15; 31,56; 14,24; 20,23; 17,96; -41,09; -74,22

**a4)** 134,45; 141,21; 156,93; 178,34; -156,87; -143,35; -130,58; -126,74; -112,27; -159,11; -53,40; -157,47; -106,61; -127,91; -135,29; -163,32; 173,02; 152,08; 143,07; 139,83

**b4)** -42,76; -51,92; -62,16; -84,62; -106,81; -124,25; -134,56; -141,72; -145,18; -146,37; -146,00; -143,48; -138,62; -132,66; -122,82; -106,47; -84,88; -61,26; -50,86; -39,68

#### **Abb. 7.4**

**a1)** -12,40; -4,24; -14,86; -89,50; -86,05; -137,47; -137,91; -169,71; 161,74; 157,76; 149,98; 163,84; 166,57; -101,44; -96,94; -137,07; -85,23; -149,57; 176,36; 143,17

**b1)** -57,19; -64,26; -79,76; 24,33; 29,94; -35,16; 50,62; 45,72; 40,76; 20,08; -115,75; -131,11; - 162,60; -160,77; -166,94; -127,36; -135,42; -122,41; -65,56; -51,88

**a2)** 106,54; 61,64; 143,93; 179,01; 153,24; -89,69; -3,49; -45,60; -36,04; -26,97; -32,20; -7,32; 10,22;

11,22; 25,39; 21,11; 56,70; -171,77; -160,77; -143,47

**b2)** 177,03; 85,57; 174,76; 137,09; 70,25; 23,38; -91,29; -80,09; -80,99; -61,36; -44,42; -42,37; - 25,18; 175,04; -45,86; 169,79; 134,24; -74,02; -98,00; -104,19

**a3)** -53,15; -45,98; -124,42; -163,81; -177,14; -178,29; -171,33; 174,28; -162,20; -126,63; -10,51; 5,09; 31,51; 138,05; 158,79; 140,96; -77,15; -51,20; 179,10; 177,71

**b3)** -131,88; -149,74; -38,68; -102,58; -8,91; -26,51; -33,14; -29,14; -21,24; -55,91; -81,69; - 45,43; -21,05; -126,70; -62,11; -66,92; 76,04; 101,03; 141,52; 149,74

#### **Abb. A.1**

**a1)** -120,47; -167,93; -26,98; -44,03; 6,98; 8,58; -9,71; 4,69; -85,04; -37,33; -13,39; 43,22; 44,08; 35,48; 31,10; -47,11; 23,68; -16,19; 102,60; 73,53

**b1)** 49,26; 17,51; -16,28; -38,16; -6,19; 12,88; 54,12; 45,35; 22,39; -41,30; -38,11; -41,75; 32,54; 5,30; 31,62; 33,47; 37,01; 29,94; -67,54; -39,99

**a2)** 109,14; 118,95; 128,18; 156,57; 171,04; -161,18; -158,95; -143,71; -154,66; -145,20; -145,59; -149,52; -118,64; -179,21; -127,63; 151,10; 146,43; 130,57; 121,22; 120,26

**b2)** 42,53; 33,86; 12,37; 7,27; -18,02; -45,07; -66,55; -66,41; -63,97; -45,70; -68,53; -53,67; - 60,33; -74,79; -36,86; -7,06; -0,57; 8,42; 37,21; 48,47

**a3)** 99,93; 109,17; 151,29; 70,51; -53,94; 104,46; -160,13; 121,34; 132,26; 131,30; 134,12; 139,90; 145,12; 20,54; 110,32; -108,00; 24,99; -53,67; -18,33; -34,58

**b3)** -93,25; -90,31; -84,78; -66,18; -82,47; -15,22; 149,60; -48,67; 12,26; 61,70; -143,31; 143,18; - 165,05; 167,27; -153,20; -112,13; -100,72; -100,07; -98,22; -101,76

**a4)** 79,14; 49,06; 3,19; 28,90; 23,57; -4,48; -94,46; -96,18; -66,44; -36,69; -43,41; -14,73; -102,55; -71,72; -29,35; 11,23; 31,30; 18,98; 62,62; 48,55

**b4)** -139,72; -112,65; -23,49; -30,15; 27,71; 31,07; 140,03; -30,21; -89,94; -99,29; -136,06; - 99,07; - 146,84; -12,95; 15,02; 10,71; -22,92; -31,92; -147,05; -131,35

## Anhang C

### Tabelle Symmetrien

$N$	$n$	$\nu_s$	$\nu_k$	$\nu_r=15$ kHz	$\nu_r=20$ kHz		$N$	$n$	$\nu_s$	$\nu_k$	$\nu_r=15$ kHz	$\nu_r=20$ kHz
9	14	-1	6	42,9	32,1		13	20	-1	8	43,3	32,5
	16	-5	-4	37,5	28,1			20	2	5	43,3	32,5
	16	3	4	37,5	28,1			22	-10	-3	39,4	29,5
10	16	-1	7	41,7	31,3			22	-8	-5	39,4	29,5
	22	-7	-3	30,3	22,7			22	-1	10	39,4	29,5
	22	4	8	30,3	22,7			22	1	8	39,4	29,5
11	14	-2	5	52,4	39,3			22	3	6	39,4	29,5
	16	-7	-4	45,8	34,4			24	-9	-4	36,1	27,1
	16	1	4	45,8	34,4			24	-8	-5	36,1	27,1
	18	-8	-3	40,7	30,6			24	-7	-6	36,1	27,1
	18	-1	8	40,7	30,6			24	3	8	36,1	27,1
	18	1	6	40,7	30,6			24	4	7	36,1	27,1
	20	-7	-4	36,7	27,5			24	5	6	36,1	27,1
	20	-6	-5	36,7	27,5		14	16	-3	5	58,3	43,8
	20	3	6	36,7	27,5			20	-9	-5	46,7	35,0
20	4	5	36,7	27,5	20	1		5	46,7	35,0		
24	-8	-3	30,6	22,9	22	-2		10	42,4	31,8		
24	-7	-4	30,6	22,9	22	-1		9	42,4	31,8		
24	-6	-5	30,6	22,9	24	-11		-3	38,9	29,2		
24	4	9	30,6	22,9	24	-1		11	38,9	29,2		
24	5	8	30,6	22,9	24	1		9	38,9	29,2		
	24	6	7	30,6	22,9	15	14	-4	3	71,4	53,6	
	20	-9	-3	40,0	30,0		16	-4	5	62,5	46,9	
	20	-7	-5	40,0	30,0		16	-3	4	62,5	46,9	
20	-1	9	40,0	30,0	18		-8	-7	55,6	41,7		
20	1	7	40,0	30,0	18		-5	8	55,6	41,7		
20	3	5	40,0	30,0	18		-4	7	55,6	41,7		
22	-8	-4	36,4	27,3	18		-2	5	55,6	41,7		
22	3	7	36,4	27,3	18		-1	4	55,6	41,7		
13	14	-3	4	61,9	46,4		18	1	2	55,6	41,7	
	16	-4	7	54,2	40,6		22	-10	-5	45,5	34,1	
	16	-1	4	54,2	40,6		22	-9	-6	45,5	34,1	
	18	-7	-6	48,1	36,1		22	-2	9	45,5	34,1	
	18	-2	7	48,1	36,1		22	1	6	45,5	34,1	
	18	2	3	48,1	36,1		22	2	5	45,5	34,1	
	20	-8	-5	43,3	32,5		24	-11	-4	41,7	31,3	
	20	-2	9	43,3	32,5	24	-10	-5	41,7	31,3		

15	24	-8	-7	41,7	31,3	19	22	-7	10	57,6	43,2
	24	-2	11	41,7	31,3		22	-4	7	57,6	43,2
	24	-1	10	41,7	31,3		22	-1	4	57,6	43,2
	24	1	8	41,7	31,3		22	1	2	57,6	43,2
	24	2	7	41,7	31,3		24	-11	-8	52,8	39,6
	24	4	5	41,7	31,3		24	-6	11	52,8	39,6
16	20	-9	-7	53,3	40,0	20	24	-4	9	52,8	39,6
	20	-5	9	53,3	40,0		24	-3	8	52,8	39,6
	20	-3	7	53,3	40,0		24	-1	6	52,8	39,6
	20	-1	5	53,3	40,0		24	1	4	52,8	39,6
	20	1	3	53,3	40,0		22	-6	8	60,6	45,5
	22	-9	-7	48,5	36,4		22	-3	5	60,6	45,5
17	22	2	4	48,5	36,4	21	24	-11	-9	55,6	41,7
	14	-5	2	81,0	60,7		24	-7	11	55,6	41,7
	16	-5	4	70,8	53,1		24	-5	9	55,6	41,7
	16	-4	3	70,8	53,1		24	-3	7	55,6	41,7
	18	-5	6	63,0	47,2		24	-1	5	55,6	41,7
	18	-4	5	63,0	47,2		24	1	3	55,6	41,7
18	18	-3	4	63,0	47,2	22	16	-4	-1	87,5	65,6
	20	-9	-8	56,7	42,5		16	4	7	87,5	65,6
	20	-5	8	56,7	42,5		18	-8	5	77,8	58,3
	20	-2	5	56,7	42,5		18	-7	4	77,8	58,3
	20	1	2	56,7	42,5		18	-5	2	77,8	58,3
	22	-9	-8	51,5	38,6		18	-4	1	77,8	58,3
19	22	-4	9	51,5	38,6	23	18	-2	-1	77,8	58,3
	22	-3	8	51,5	38,6		18	7	8	77,8	58,3
	22	-2	7	51,5	38,6		20	-7	6	70,0	52,5
	22	2	3	51,5	38,6		20	-6	5	70,0	52,5
	24	-11	-6	47,2	35,4		20	-5	4	70,0	52,5
	24	-9	-8	47,2	35,4		20	-4	3	70,0	52,5
20	24	-4	11	47,2	35,4	24	22	-7	8	63,6	47,7
	24	-1	8	47,2	35,4		22	-6	7	63,6	47,7
	24	1	6	47,2	35,4		22	-5	6	63,6	47,7
	24	3	4	47,2	35,4		22	-4	5	63,6	47,7
	16	-5	3	75,0	56,3		22	-3	4	63,6	47,7
	20	-5	7	60,0	45,0		24	-11	-10	58,3	43,8
21	20	-3	5	60,0	45,0	25	24	-8	11	58,3	43,8
	22	-6	10	54,5	40,9		24	-7	10	58,3	43,8
	22	-1	5	54,5	40,9		24	-5	8	58,3	43,8
	14	-6	1	90,5	67,9		24	-4	7	58,3	43,8
	16	-7	4	79,2	59,4		24	-2	5	58,3	43,8
	16	-4	1	79,2	59,4		24	-1	4	58,3	43,8
22	18	-6	5	70,4	52,8	26	24	1	2	58,3	43,8
	18	-5	4	70,4	52,8		16	-7	1	91,7	68,8
	18	-4	3	70,4	52,8		20	-7	5	73,3	55,0
	20	-6	7	63,3	47,5		20	-5	3	73,3	55,0
	20	-5	6	63,3	47,5		24	-7	9	61,1	45,8
	20	-4	5	63,3	47,5		24	-5	7	61,1	45,8
23	20	-3	4	63,3	47,5	27	24	-3	5	61,1	45,8
	22	-10	-9	57,6	43,2		14	-1	6	109,5	82,1
	16	-4	-3	95,8	71,9		24	-8	9	63,9	47,9

16	4	5	95,8	71,9		24	-7	8	63,9	47,9
18	-7	2	85,2	63,9		24	-6	7	63,9	47,9
18	-3	-2	85,2	63,9		24	-5	6	63,9	47,9
18	6	7	85,2	63,9		24	-4	5	63,9	47,9
20	-8	5	76,7	57,5		24	-3	4	63,9	47,9
20	-5	2	76,7	57,5	24	20	-9	5	80,0	60,0
20	-2	-1	76,7	57,5		20	-7	3	80,0	60,0
20	8	9	76,7	57,5		20	-5	1	80,0	60,0
22	-8	7	69,7	52,3		20	-3	-1	80,0	60,0
22	-7	6	69,7	52,3		20	7	9	80,0	60,0
22	-6	5	69,7	52,3		22	-8	6	72,7	54,5
22	-5	4	69,7	52,3		22	-5	3	72,7	54,5
22	-4	3	69,7	52,3						

**Tab. C.1:** Symmetriebasierte  $RN_n^{V_s, V_k}$ -Pulssequenzen mit  $N \leq 24$  und  $n > 9$  basierend auf den Auswahlregeln für Zweikanal-Sequenzen zur Selektion der symmetrieerlaubten Terme  $(m, \mu_s, \mu_k) = \{(1, -1, -1), (-1, 1, 1)\}$ . Zusätzlich sind die entsprechenden Längen der R-Basiselemente für verschiedene Drehfrequenzen angegeben.



## Anhang D

# repräsentative Prozessierungsskripte

Umwandlung von NHHC-/CHHC-Brukerdaten in das nmrPipe-Format:

```
#!/bin/csh
bruk2pipe -in ../ser \
-bad 0.0 -aswap -DMX -decim 800 -dspfv 20 -grpdly 67.9839172363281 \
-xN 512 -yN 160 \
-xT 248 -yT 80 \
-xMODE Complex -yMODE Complex \
-xSW 25000.000 -ySW 12500.000 \
-xOBS 125.704 -yOBS 125.704 \
-xCAR 748551.658 -yCAR 748551.658 \
-xLAB 13Cx -yLAB 13Cy \
-ndim 2 -aq2D States \
-out ./test.fid -verb -ov
```

Extrahierung des NHHC-Datensatzes:

```
#!/bin/csh -f
set N = (1 0 0 1 -1 0 0 -1)
echo $N
nmrPipe -in test.fid \
| nmrPipe -fn QMIX -ic 4 -oc 2 -cList $N -time -out ./npart.fid -verb -ov
```

Extrahierung des CHHC-Datensatzes:

```
#!/bin/csh -f
set C = (1 0 0 1 1 0 0 1)
echo $C
nmrPipe -in test.fid \
| nmrPipe -fn QMIX -ic 4 -oc 2 -cList $C -time -out ./cpart.fid -verb -ov
```

# Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Christian Herbst

Jena, den 3. Mai 2010

# Lebenslauf

Christian Herbst

03.10.1980

geboren in Gera

1987-1991

Heinrich-Heine-Schule, Königshofen

1991-1995

Friedrich-Schiller-Gymnasium, Eisenberg

1995-1999

Carl Zeiss Gymnasium mit mat.nat.techn. Spezialklassen, Jena

1999

Abitur

1999-2000

Fernstudium Wirtschaftsmathematik an der Fernuniversität Hagen

2000-2006

Studium der Physik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

02.03.2006

Abschluss als Diplom-Physiker

seit 03/2006

wissenschaftlicher Mitarbeiter am FLI-Leibniz-Institut, Jena

2010

Dissertation: „Korrelationen der chemischen Verschiebung an schnell rotierenden biologischen Festkörpern mittels NMR-Spektroskopie“

Christian Herbst

Jena, den 3. Mai 2010